



**PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA *BRAF V600E*
MUTASYONUNUN REALTİME PZR ANALİZİ**

Serpil ÇAKIR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Serpil ÇAKIR

05/07/2024

PAPİLLER TİROİD KARSİNOMLARINDA BRAF V600E MUTASYONUNUN
REALTIME PZR ANALİZİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Serpil ÇAKIR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

ÖZET

Papiller tiroid karsinomları (PTK) çoğunlukla, genlerdeki *BRAF* ve *RAS* mutasyonlarından kaynaklı MAPK aktivasyonu ile hücre bölünmelerinde artışa neden olur. *BRAF V600E* 'nin PTK'de kötü prognozla ilişkisi olduğu bilinmektedir. Literatürde, PTK hastalarında *BRAF V600E* mutasyonu ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan elde edilen bulgular arasında farklılıklar yer almaktadır. Bu çalışmada PTK'de *BRAF V600E* mutasyonunun realtime PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği kullanılarak tespiti ve toplumdaki sıklığının ortaya konulması ile bugüne kadar elde edilmiş bulgulara yeni bulgular ekleyerek bu alanda var olan literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir. Bu çalışma klasik varyant, folliküler varyant ya da tall cell (uzun hücre) varyant PTK tanısı almış 100 olgudan alınan formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş (FFPE) tiroid dokularıyla yapılmıştır. Tümörlü dokuyu örnekleyen kesitlerden yeterli miktarda DNA içeren örneklerden *BRAF V600E* mutasyon tespit kiti kullanılarak realtime PZR tekniği ile *BRAF V600E* mutasyonu varlığı araştırılmıştır. Sonuçta, yedi örnekten analiz için yeterli DNA elde edilememiş, geriye kalan 88 örneğin 30'unun (%34,1) *BRAF V600E* negatif, 58'inin (%65,9) pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu mutasyonun pozitifliğinin PTK varyantlarındaki dağılımı, klasik varyantta %90,4, folliküler varyantta % 11,5 ve uzun hücre varyantta % 80,0 olarak bulunmuştur. Örneklerin *BRAF V600E* pozitifliği ile yaş, tümör kapsül varlığı, lenf nodu metastazı, yumuşak doku invazyonu ve tiroid kapsül invazyonu değişkeni arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu verilerden hareketle PTK'li olguların takibinde ve hastalığın tedavisinde kullanılan yöntemi belirlemede daha büyük olgu grupları ile yapılacak çalışmaların ve *BRAF*'ın diğer mutasyonlarının analizinin de katkı sunacağı düşünülmektedir.

Bilim Kodu : 20326
Anahtar Kelimeler : BRAF V600E, kanser, mutasyon, papiller tiroid kanseri, PZR tiroid
Sayfa Adedi : 83
Danışman : Prof. Dr. Leyla AÇIK

REALTIME PCR ANALYSIS OF *BRAF* V600E MUTATION IN PAPILLARY
THYROID CARCINOMAS

(M. Sc. Thesis)

Serpil ÇAKIR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

Papillary thyroid carcinomas (PTC) often cause increased cell divisions through MAPK activation caused by *BRAF* and RAS mutations in the genes. *BRAF* V600E is associated with poor prognosis in PTC. There are few studies in the literature on *BRAF* V600E mutation in PTC patients, and the findings from these studies are different. This study aims to contribute to the existing literature in this field by detecting the *BRAF* V600E mutation in PTC using the realtime PCR technique and determining its frequency in the population. This study was conducted with formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) thyroid tissues taken from 100 cases diagnosed with classical, follicular or tall cell variant PTC. DNA was isolated from sections sampling tumor tissue, and the presence of mutation was investigated with realtime PCR in samples containing sufficient DNA. However, sufficient DNA could not be obtained for analysis from 5 samples, in the realtime PCR study performed with 95 samples, no results were obtained in 7 samples, *BRAF* V600E was negative in 30 of the remaining 88 samples (34.1%), and positive in 58 (65.9%). has been detected. The distribution of the positivity of this mutation in PTK variants was found to be 90.4% in the classical variant, 11.5% in the follicular variant and 80.0% in the tall cell variant. A statistically significant relationship was detected between *BRAF* V600E positivity of the samples and age, presence of tumor capsule, lymph node metastasis, soft tissue invasion and thyroid capsule invasion variables ($p<0.05$). Based on this data, it is thought that studies with larger case groups and analysis of other mutations of *BRAF* will contribute to determining the method used in the follow-up and treatment of PTC.

Science Code : 20326

Key Words : *BRAF* V600E, canser, mutation, papillary thyroid cancer, PCR, thyroid

Page Number : 83

Supervisor : Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında, bilgisi, tecrübesi ve önerileri ile bana yol gösteren ve destek olan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK’a, laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen “Yıldırım Beyazıt Üniversitesi” Doç. Dr. Hayriye Tatlı DOĞAN’a, tezimin istatistiksel verilerini yapmamda destek olan ve dara düştüğüm her an önümü açan ablam “Sivas Cumhuriyet Üniversitesi” Doç. Dr. Zühal YURTSIZOĞLU’na, literatür araştırmalarımında destek olan dostum “Giresun Üniversitesi” Doç. Dr. Derya EFE’ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, sevgili oğullarım Ediz Ali ve Demir Erdem’e ve tezimin tamamlandığını göremeden vefat eden canım anneme ithaf olunur.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kansere neden olan çevresel ve genetik faktörler.....	5
2.2. Tiroid.....	7
2.2.1. Tiroid kanseri	8
2.2.2. Papiller tiroid karsinomu (PTK)	12
2.3. Tiroid Kanserinde Moleküler Patogenez	18
2.3.1. Çok basamaklı karsinogenez.....	18
2.3.2. Fetal hücre karsinogenez.....	19
2.3.3. Kanser kök hücre karsinogenez	20
2.4. Mitojen Tarafından Aktive Olmuş Protein Yolağı (<i>Mapk</i>) ve <i>Braf</i> Geni	20
2.4.1. MAPK yolağı	22
2.4.2. <i>BRAF</i> geni ve mutasyonu.....	25
2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
2.5.1. PZR yönteminin prensipleri ve aşamaları	28

	Sayfa
2.5.2. Realtime PZR.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Çalışma Grubu	31
3.2. Gereçler	31
3.3. Yöntem.....	31
3.3.1. Dokulardan parafinin uzaklaştırılması	32
3.3.2. Lam üzerindeki dokudan tümörlü alanın alınması.....	32
3.3.3. Tüplerde yer alan dokudan DNA izolasyonu.....	32
3.3.4. Elde edilen DNA miktarlarının florometrik yöntem ile ölçülmesi	34
3.3.4. Realtime PZR <i>BRAF V600E</i> mutasyon analizi	35
4. SONUÇ.....	39
4.1. Realtime PZR Analizi Verileri.....	39
4.2. İstatistiksel Analiz Sonucu	45
4.2.1. Demografik, patolojik ve klinik veriler.....	45
4.2.2. Demografik, patolojik ve klinik verilere ait istatistiksel değerlendirmeler	50
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ.....	83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. DNA izolasyonu kiti içeriği.....	33
Çizelge 3.2. DNA miktarı analizi kiti içeriği	34
Çizelge 3.3. Realtime PZR <i>BRAF V600E</i> mutasyon analizi kiti içeriği	35
Çizelge 3.4. Realtime PZR sıcaklık döngüleri.....	36
Çizelge 3.5. Realtime PZR sonuçları değerlendirme ölçütleri	37
Çizelge 3.6. Ct değerleri değerlendirme kriterleri	37
Çizelge 4.1. Olguların cinsiyete göre dağılımı	46
Çizelge 4.2. Olguların yaş kategorisine göre dağılımı.....	46
Çizelge 4.3. PTK varyantı.....	46
Çizelge 4.4. Tümör kapsül varlığı.....	47
Çizelge 4.5. Tümör kapsül invazyonu	47
Çizelge 4.6. Lenf nodu metastazı.....	47
Çizelge 4.7. Vasküler invazyon	48
Çizelge 4.8. Yumuşak doku invazyonu	48
Çizelge 4.9. Tiroid kapsül invazyonu	48
Çizelge 4.10. <i>BRAF V600E</i> mutasyonu analizi verileri.....	49
Çizelge 4.11. Demografik, patolojik ve klinik veriler	49
Çizelge 4.12. Cinsiyet * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu.....	50
Çizelge 4.13. Yaş kategori * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu.....	51
Çizelge 4.14. PTK varyantı * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	51
Çizelge 4.15. Tümör kapsül varlığı * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	52
Çizelge 4.16. Tümör kapsül invazyonu * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	53
Çizelge 4.17. Lenf nodu metastazı * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	53
Çizelge 4.18. Vasküler invazyon * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	54
Çizelge 4.19. Yumuşak doku invazyonu * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	55

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.20. Tiroid kapsül invazyonu * <i>BRAF V600E</i> mutasyonu	55
Çizelge 4.21. Demografik, patolojik ve klinik verilerle <i>BRAF V600E</i> mutasyonu ilişkisi .	56



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tiroid bezi (folliküler ve parafolliküler hücreler)	8
Şekil 2.2. Çok basamaklı karsinogenez	19
Şekil 2.3. Fetal hücre karsinogenez	20
Şekil 2.4. Kanseri kök hücre karsinogenez	20
Şekil 2.5. MAPK (ERK, JNK ve P38 alt grupları) sinyal yolakları	21
Şekil 2.6. MAPK yolağı.....	24
Şekil 2.7. MAPK sinyal ileti yolaklarının tiroid kanserindeki etkisi	25
Şekil 2.8. <i>BRAF</i> mutasyonu ve kanserleşme	26
Şekil 2.9. <i>BRAF</i> tarafından aktive edilen hücre içi sinyal yolakları	27

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. 1. plaka <i>BRAF V600E</i> negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	40
Resim 4.2. 1. plaka <i>BRAF V600E</i> pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	40
Resim 4.3. 1. plaka endojen kontrol negatifler realtime PZR analizi görüntüsü	41
Resim 4.4. 1. plaka endojen kontrol pozitifler realtime PZR analizi görüntüsü.....	41
Resim 4.5. 2. plaka <i>BRAF V600E</i> negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	42
Resim 4.6. 2. plaka <i>BRAF V600E</i> pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	42
Resim 4.7. 2.plaka endojen negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	43
Resim 4.8. 2. plaka endojen pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	43
Resim 4.9. 3. plaka <i>BRAF V600E</i> negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	44
Resim 4.10. 3. plaka <i>BRAF V600E</i> pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü	44
Resim 4.11. 3. plaka endojen kontrol pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

cm	Santimetre
%	Yüzde
>	Büyüktür
&	Ve

Kısaltmalar

Açıklamalar

A	Adenin
ADTK	Az differansiye tiroid kanseri
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz reseptörü
ATK	Anaplastik tiroid karsinomu
BRAF	v-Raf mürin sarkoma viral onkogen homologu B1
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleikasit trifosfat
DTK	Diferansiye tiroid kanseri
E	Glutamik asit
EBV	Epstein-Barr virüsü
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
FFPE	Formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş
FOX E1	Forkhead box E1
FTK	Foliküler tiroid karsinomu
FVPTK	Papiller tiroid karsinomunun folliküler varyantı
G	Guanin
GTPaz	Guanozin trifosfataz
H&E	Hematoksilen ve Eozin
HBV	Hepatit B virüs

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HHK	Hürtle hücreli karsinom
I	İyot
ICD	Uluslararası hastalık sınıflaması
JNK	cJun NH2-terminal kinaz
KPTK	Klasik papiller tiroid karsinomu
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
Mi-RNA	Mikro ribonükleik asit
MÖ	Milattan önce
MTK	Medüller tiroid kanseri
NTRK	Nörotropik tirozin kinaz reseptör
PAX8	Paired box gene 8 (Eşli kutu geni 8)
PPARγ	Peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör gamma füzyon protein
PTK	Papiller tiroid kanseri
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAF	Protoonkogen serin/threonin-protein kinaz
RAS	Rat sarkoma protoonkogen
RET/PTK	Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş / Papiller tiroid karsinomu
RTK	Reseptör tirozin kinaz
T	Timin
T3	Triiyodotironin
T4	Tiroidksin
TCPTK	Tall-cell papiller tiroid kanseri
TGB	Tiroglobulin
TRK	Tirozin kinaz reseptör
TTF-1	Tiroid transkripsiyon faktörü-1
TTF-2	Tiroid transkripsiyon faktörü-2
UV	Ultraviyole ışınları
V	Valin amino asit

1. GİRİŞ

Endokrin sistem kanserleri içinde en sık ortaya çıkan kanser türü tiroidin kanserleridir. 2007 yılında yapılan bir çalışmada tiroid kanserlerinin tüm endokrin malignitelerin yaklaşık olarak %94'ünden sorumlu olduğu görülmüştür [1]. Tiroid dokusunda ortaya çıkan kanserler, tiroidin folliküler hücrelerinden ya da parafolliküler C hücrelerinden köken alır [2]. 2008 yılında yapılan bir çalışmada tanı alan 37.340 yeni tiroid karsinomu olgusunun yaklaşık %75 kadarının papiller tiroid karsinomu (PTK) olduğu görülmüştür [3]. Dünyanın gelişmiş ülkelerinde gerçekleşen ölümlerin beşte birinden sorumlu olan kanser, yaklaşık olarak iki yüz ayrı çeşit hastalığın ortak adıdır [4]. Bu hastalıklardan biri olan tiroid kanseri en sık ortaya çıkan endokrin malignitelerden biri olmakla birlikte tüm malignitelerin de yaklaşık olarak %1'inden sorumludur. Her ne kadar toplumlarda ortaya çıkan tiroid karsinomlarının insidansı artsa da hastalığın erken tanısında ve tedavi edilmesinde kat edilen yol bu hastalıktan kaynaklı ölümlerin oranında azalmaya neden olmuştur [5].

Tiroid karsinomlu olguların yaklaşık olarak %80'inde görülen papiller tiroid karsinomu, tiroid karsinomları türleri arasında, diğer türlere kıyasla daha sık ortaya çıkan tiroid karsinomu türüdür ve tiroidin folliküler epitel hücrelerinden köken alır [6]. Tiroid kanserinde bu türün ortaya çıkmasında Rat sarkoma (RAS) protoonkogen mutasyonları, protoonkogen serin/threonin-protein kinaz (RAF) mutasyonları ve RET/Protein tirozin kinaz'ın (RET/PTK) yeniden ifadesi etken olmaktadır [7,8].

BRAF proteini serin-threonin RAF kinaz ailesinde yer alır ve aynı zamanda RAS-RAF-MAPK sinyal iletim yolağında da bir önemli işleve sahiptir. Normal hücrelerde büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi hücrenin yüzeyinde yer alan reseptörlere bağlanabilen mitojenlerle kontrol edilebilen bu yolak, hücrelerin farklılaşması, hayatta kalabilmesi ve proliferasyonunda önemli bir rol üstlenmektedir. Aktive edici *BRAF* mutasyonlarının ortaya çıkışı MEK-ERK yolağının kontrolsüzce aktifleştirmesini sağlayarak hücrelerin normal formundan tümör hücresi haline dönüşümüne neden olur. *BRAF* V600E mutasyonu, *BRAF* mutasyonları arasında en sık rastlanan aktive edici mutasyondur [9]. Yedinci kromozomun uzun olan kolunda (7q34) yer alan ve 18 adet ekzon içeren *BRAF* geni, *BRAF* "aktive edici" yanlış anlamlı nokta mutasyonlarına sahiptir. Bu genin ekzon 11 ve ekzon 15'inde meydana gelen T1799A transversiyon (değişim) mutasyonu, *BRAF* mutasyonlarının %80'den fazlasının ortaya çıkmasından sorumlu olan

mutasyondur. T1799A mutasyonu ile kodon 600 protein ürününde valin amino asit (V) , glutamik asite (E) dönüşür (*BRAF V600E*) , bu aminoasit dönüşümü de *BRAF* kinazın sürekli aktif kalması ile sonuçlanır [10 -14].

BRAF V600E mutasyonu, tiroitte ortaya çıkan tüm karsinomlar arasından sadece papiller tiroid karsinomunda yaygın olarak görülür ve bu hastalık için tanı koydurucu öneme sahiptir [6,15].

BRAF V600E mutasyonunun PTK'li olgularda görülme sıklığı ile ilgili olarak literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılacak olan bu çalışma ile papiller tiroid karsinomu tanısı almış olgularda *BRAF V600E* mutasyonunun toplumdaki insidansının ortaya çıkarılması, tedavide etkili yöntemlerin geliştirilmesine bu vesile ile de literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları ile ortaya çıkan ve bağışıklık sisteminden kaçarak ortaya çıktığı dokudan daha uzak dokulara da yayılarak geçirdiği hem metabolik hem de davranışsal değişikliklerle metastazlara neden olabilen birden fazla basamağa sahip bir süreç olarak ortaya çıkmaktadır. Bu süreç genellikle, hücrelerin ömürleri, bölünmeleri, komşu hücrelerle olan ilişkilerini ve bağışıklık sistemi karşısında görünmez olabilme yeteneklerini denetleyen genetik programlardaki yeniden düzenlemelerin ortaya çıkması ve birikmesi ile meydana gelir. Kansерleşmiş hücreler normal hücrelerin sahip olduğu büyüme, bölünme ve davranışlara sahip olmadıklarından “asi” olarak tanımlanabilecek hücrelere dönüşerek kontrolsüz bölünmelerle kitle oluşumuna neden olurlar. Bu şekilde dokuda ortaya çıkabilen bir kitle belirli bir zaman diliminde herhangi bir belirti göstermeden varlığını sürdürebildiği gibi daha da büyüyerek fizyolojik işlevlerde aksaklıkların ortaya çıkmasına neden olarak organizmada birçok semptomun ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olur [16].

Kanser, tüm dünya üzerinde, kalp damar sistemi hastalıklarından sonra insan toplumlarındaki ölümlerin en sık ikinci nedenidir. Bu bağlamda kanser ortaya çıkardığı mortalite ve morbidite etkilerinden dolayı üzerinde durulması gereken ciddi bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır [17].

Kanseri dünya tarihinde bir terim olarak ilk kez Hippocrates (MÖ:460-370) kullanmıştır. Hippocrates kanser kelimesini kullanmasının yanında, kansere neden olabilen tümörleri iyi huylu (selim) veya kötü huylu (habis) olmasına göre de ayıran ilk kişidir. Kanser oldukça genel bir ifade ile insan vücudunda herhangi bir dokuyu ya da organı etkileme olasılığına sahip olan bir takım hastalığı ifade eder. Bir dokuda veya organda bulunan hasar görmüş hücrelerin kontrollerini yitirerek, sık ortaya çıkan hücre bölünmeleri ile bir kitle veya tümör oluşturması ile devam eden bir süreç olarak ortaya çıkar [18].

Sık hücre bölünmeleri görüldüğü sırada, kanserli hücrelerde, normal işleve sahip hücrelerde görülmeyen bazı yapısal ve işlevsel farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Bu farklılıklar, kimi zaman hücrelerin normalde yaptığı işlevlerini yerine getirememeleri şeklinde ortaya

çıkarken kimi zaman da normal koşullarda hücrenin gerçekleştirmediği bazı yeni işlevleri de yapmaya başlaması, şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Normal olmayan bir şekilde kontrolsüzce bölünerek çoğalan bu hücreler bulundukları yerdeki doku ve organları hatta bazen daha uzakta bulunan bazı organları ele geçirerek onları istila etmekte ve istila ettiği bu yapıların işlevlerini düzgün şekilde yerine getirmesine engel olmaktadır. Hücrelerin bölünmeleri sırasında kontrolün bozulup kanser olarak tanımlanacak tablonun ortaya çıkması, kanserin çeşidine göre farklılık gösterir.

Kanser, genellikle organizmanın kendisi dışındaki etkiler sonucunda edinsel olarak, çoğunlukla çevresel faktörlerin etkisiyle kendiliğinden ortaya çıkan ve DNA 'da ortaya çıkan mutasyonların bir sonucu olarak da oluşabilen genetik bir hastalıktır. DNA'da meydana gelen bu mutasyonlar sonucunda hücrelerin büyüme, bölünme ve yaşlanma gibi faaliyetlerini düzenleyen genlerde farklılıklar meydana gelir. Meydana gelen bu farklılıklar hücre bölünmeleri ile yavru hücrelere aktarılır. Yavru hücrelere aktarılan ve hücrelerde biriken bu mutasyonlar kansere özel bir takım özelliklerin ortaya çıkmasına neden olur [19].

Bu özellikler;

- Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) karşısında geliştirilen direnç,
- Anjiyogenez (büyüme ve bölünme gibi faaliyetleri sürdürebilmek için gerekli olan maddeleri sağlamak amacı ile yeni damar oluşumu) yeteneğinde artış,
- Sonsuz bölünme gücü ile ortaya çıkan “ölümsüz hücre” özelliği,
- Hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol eden inhibitör sinyallere cevap oluşturmama,
- Kendi büyüme sinyallerini kazanma ve normal fizyolojik kurallara uymayan büyüme,
- Yakın ve uzak dokulara yayılım gösterme ve bağışıklık sisteminden kaçınma ve bu sisteme direnç gösterme şeklinde sıralanabilir [19].

Ortaya çıkışı, gelişim süreçleri ve neden olduğu sonuçlar bakımından, kişiden kişiye oldukça farklı ilerleyebilen ve karmaşık bir doğası olan kanserin hücresel ve moleküler düzeydeki altyapısı da benzer farklılıklara sahiptir [16].

2.1.1. Kansere neden olan çevresel ve genetik faktörler

İnsanlarda görülen kanserlerin üçte birinde, kansere neyin neden olduğu bilinmekle birlikte birçok kanserin ortaya çıkışında çevresel faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir. Bunun yanında kalıtsal bazı faktörlerin de kanser ortaya çıkmasında etken bir role sahip olduğu bilinen bir gerçektir. Genel olarak bireyin genetik bazı faktörlere sahip olmasının yanında çevreden maruz kaldığı karsinojenler de (kansere yapıcı etken) kanserin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Kanserin ortaya çıkışında etkisi olduğu düşünülen başlıca faktörler şunlardır:

Sigara ve tütünlu madde kullanımı: Tütün kullanımına bağlı olarak geliştiği bilinen yaklaşık on üç farklı kanser türü olduğu bilinmektedir. Sigara ve tütünlu maddelerin kullanımı özellikle akciğer kanserinin ortaya çıkmasında rol alan oldukça önemli bir faktördür ve kanserin ortaya çıkma riskini on-yirmi kat arası bir oranda arttırdığı bildirilmiştir [20,21].

Akciğer kanserine yakalanma ve sigara kullanımı arasında bir ilişki olduğu ilk defa 1912 yılında öne sürülmüştür [22]. Sigaranın ve tütün kullanımının, akciğer kanseri dışında başka yutak, larinks, ağız boşluğu, mesane, pankreas kanseri ve lösemi gibi birçok kanser türünün ortaya çıkmasında da rol oynadığı bilinmektedir [23,24].

Alkol kullanımı: Alkol kullanımı oldukça fazla sayıda sağlık sorunun ortaya çıkmasına neden olmanın yanı sıra, ağız, larinks, farinks, özofagus, karaciğer, kolorektal, meme ve pankreas kanserine yakalanma riskini de artırır [25].

Hava kirliliği: İnsanların bulunduğu ortamın hava kalitesindeki olumsuzluklar kimi zaman tek başına, kimi zaman ise sigara kullanımı ile birlikte özellikle akciğer kanserlerinin etiyolojisinde rol oynamaktadır [26].

Kimyasal maddeler: Belirli bazı meslek gruplarında faaliyet gösteren insanların katran, kömürün yanma ürünleri, benzen, naftilaminler, asbest, vinil klorür, krom vb. maddelerle maruziyetlerinin bazı kanser türlerine yakalanma riskini ortaya çıkardığı ya da artırdığı bilinmektedir. Örneğin, boya sanayinde çalışan insanlarda mesane kanseri, plastik sanayinde çalışan insanlarda karaciğer kanseri, katranla uğraşan işlerde çalışan insanlarda deri

kanseri, asbestle uğraşılan işlerde çalışan insanlarda mezotelyoma (akciğer zarı kanseri) daha sık olarak ortaya çıkmaktadır [27,28].

Ultraviyole ışınları: UV ışın yayan kaynaklar; güneş, solaryum için kullanılan cihazlar, kaynak yapımında kullanılan cihazlar, ticari, endüstriyel ve sağlık alanında kullanılan bazı cihazlar olarak sıralanabilir. UV ışınları oldukça yüksek enerji içeren ışınlardır ve maruz kalındığında DNA üzerinde hasarlara yol açabilir. UVA, UVB ve UVC olmak üzere 3 çeşit UV ışını vardır. Bunlardan UVA ışınları zayıf etkiye sahip olan UV ışınlarıdır. Ultraviyolenin daha güçlü bir çeşidi olan UVB ışınlarının ise direk DNA hasarından sorumlu olmasının yanında bazı cilt kanserlerinin etiolojisinde de önemli rol oynadığı bilinmektedir. UVC ışınları bu üç çeşit UV ışınının içinde en güçlü olanıdır ancak bu ışınlar genellikle ozon tabakasından geçemedikleri için çok fazla hasara neden olmazlar [29,30].

İyonize radyasyon: Hastalıklara tanı koyabilmek ya da hastalıkları tedavi etmek amacı ile kullanılan iyonize radyasyon da DNA hasarına neden olarak uzun vadede kansere yakalanma riskini arttırabilmektedir. Öncelikli olarak lösemiler ve epitel kökenli kanserler başta olmak üzere farklı kanserlerin ortaya çıkmasına neden olan iyonize radyasyonun alınma dozu ve kişinin iyonize radyasyona maruz kalma süresi kanser yapıcı etkisi açısından öneme sahiptir [31,32].

Beslenme ve diyet: Bireylerin beslenme alışkanlıkları, hangi besini, ne sıklıkla, ne kadar tükettikleri, özellikle sindirim sistemi kanserlerinin ortaya çıkması ile yakından ilişkilidir. Kiloda görülen fazlalık ve obezite bireylerin kolorektal, meme, endometriyum, özofagus, pankreas kanseri gibi bazı kanser çeşitlerine yakalanma riskinde artışa neden olmaktadır [33,34].

Mikroorganizmalar: Tüm dünyada insanlarda görülen kanserlerin yaklaşık olarak %15-20'sinin nedeni enfeksiyona neden olan bazı biyolojik ajanlardır. Enfeksiyona neden olan bu ajanlar ile bazı kanser çeşitlerinin ortaya çıkması arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Örneğin; hepatosellüler karsinom ile Hepatit B virüs (HBV), burkitt lenfoma ile Epstein-Barr virüsü (EBV), mide kanserleri ile *Helicobacter pylori* arasında yakın ilişki olduğu tespit edilmiştir [35].

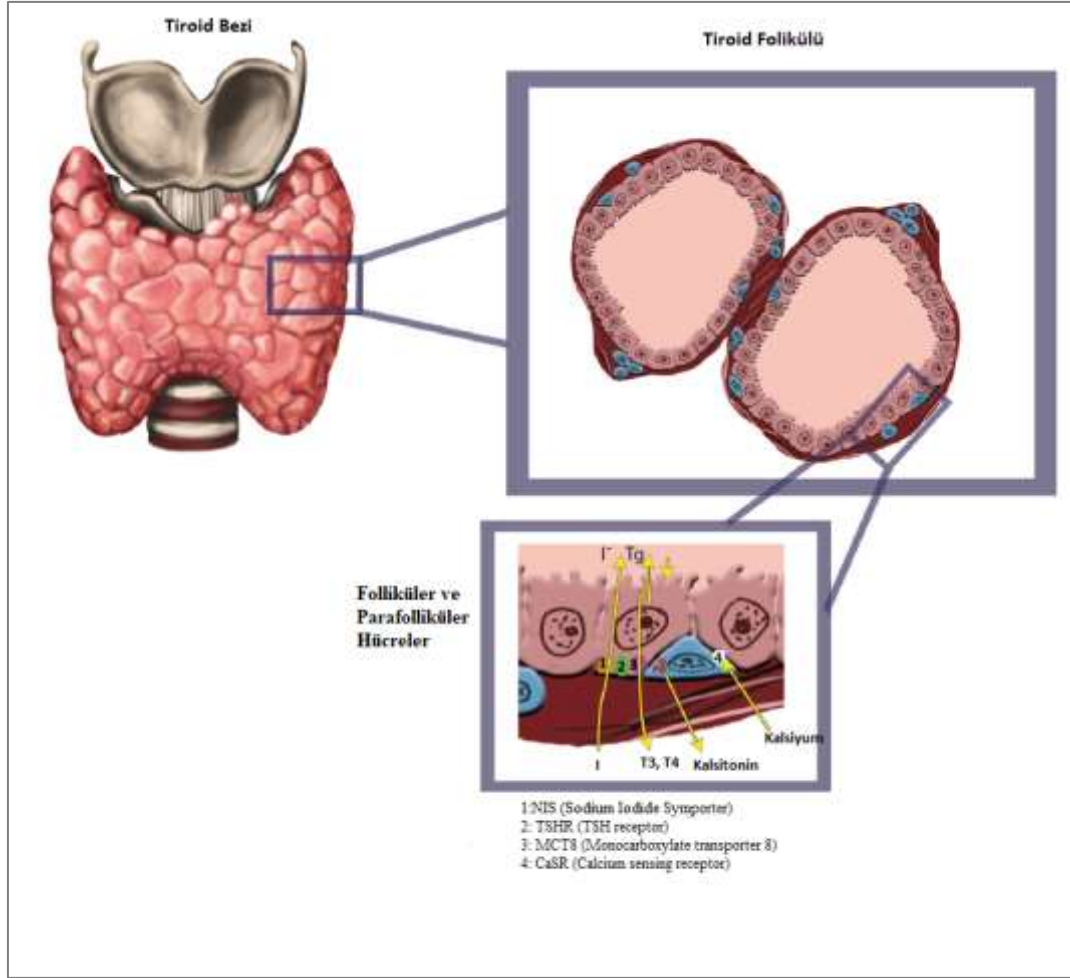
Genetik: Birçok kanser türünün ortaya çıkmasında genellikle çevresel etkenler etkili olsa da, bireylerde kanserin ortaya çıkma riskini artıran bazı genetik durumlar da mevcuttur. DNA'nın yapısında bulunan azotlu organik bazların sıralamasında mutasyon olarak tanımlanan bazı değişiklikler ortaya çıktığında organizmada kanserleşme görülebilir [36].

Bireylerde birçok kanser türünün oluşumunda, hücrelerin genetik yapısında meydana gelen mutasyonlar gibi bazı değişikliklerin etkili olduğu oldukça uzun bir zamandan beri bilinmektedir [37]. Bu şekilde bazı kanser türlerinin ortaya çıkması ailesel geçiş ile gerçekleşmekte iken diğer birçok kanser türünün oluşumu ise ailesel olarak aktarılan kalıtsal özellik taşımamaktadır.

2.2. Tiroid

Tiroid bezi, her biri yaklaşık olarak 20-40 folliküle sahip olan lopçuklardan meydana gelen endokrin bir yapıdır. Erişkin bir insan da yaklaşık olarak 15-20 gr ağırlığında olan tiroid bezi krikoid kıkırdağın altında olacak şekilde trakea önünde bulunur ve istmus adı verilen bir yapı ile birleşmiş iki loptan oluşmuştur. Tiroid bezi tiroisitler (tek katlı folliküler hücreler) ile kaplı, orta kısmı kolloid içeren folliküler hücrelerden meydana gelir. Proliferasyon aktivitesi yaşam dönemine göre değişiklik gösteren folliküler hücreler, prenatal dönemde en yüksek seviyede bölünürken erişkin dönemde en düşük seviyede bölünür. Dönüşüm hızı oldukça düşük olan bu hücreler insanın tüm hayatı boyunca yaklaşık olarak altı ya da sekiz bölünme geçirir. Folliküller, merkezdeki kolloidin etrafını saran epitelyal hücrelerle kaplıdır [114].

Tiroidin folliküler epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserleri Papiller Tiroid Kanseri (PTK) ve Folliküler Tiroid Kanseri (FTK) olmak üzere iki çeşittir. Tiroid bezinin diğer önemli hücresi, follikül duvarının bazal membrana yakın kısımlarında ya da interfolliküler stromada, tek tek ya da küçük gruplar halinde yerleşen, C hücreleri olarak da adlandırılan parafoliküler C hücreleridir (Şekil 2.1) [114].



Şekil 2.1. Tiroid bezi (folliküler ve parafolliküler hücreler) [114]

Fazla miktarda norosekratuar granül içeren bu hücrelerin yapı ve işlevleri follikül epitel hücrelerinden oldukça farklılık gösterir ayrıca bu hücreler kalsitonin hormonu sentezlenmesi ve salgılanması işini de yürütürler. Bu C hücrelerinden ise başka bir tiroid kanseri türü olan, Medüller Tiroid Kanseri (MTK) köken alır [39-42].

Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yeni tespit edilen 33.500 tiroid kanseri olgusunun yaklaşık olarak %90'ının iyi diferansiye kanserler grubunda (papiller ve folliküler), %5-9'unun medüller kanser grubunda ve %1-2'sinin ise anaplastik kanserler grubunda olduğu bildirilmiştir [2].

2.2.1. Tiroid kanseri

İnsan vücudunda ortaya çıkan kanserlerin birçoğunda ortak olarak görülen bazı özelliklerin görülmemesi ile tiroid kanserini diğer bazı kanser türlerinden farklı kılan özellikler bulunur.

Prekanseröz formlar çoğu solid organ kanserinin belirgin özelliklerinden biri iken tiroid kanserinin sık görülen alt tipi olan papiller tiroid karsinomunda prekanseröz forma rastlanmaz [44]. Benzer şekilde yüksek proliferasyon hızına sahip olan kolon, mide, akciğer ve meme gibi organların iyi diferansiye karsinomlarının tersine tiroidin iyi diferansiye karsinomlarında proliferasyon hızı düşüktür [45-47]. Yüksek proliferasyon hızına sahip karsinomlarda programlanmış hücre ölümü olan apoptoz daha sık görülürken tiroidin iyi diferansiye karsinomlarında ya nadiren apoptoz görülür ya da hiç görülmez [46, 48,49].

Tiroidin folliküler ve parafoliküler hücrelerinden kaynaklanan kanserlerin özgül bazı hücresel davranış mekanizmaları vardır. Bu kanserlerin tanısı, tedavi yaklaşımları ve takip basamakları bu özellikler dikkate alınarak yapılmalıdır.

İnsidans ve epidemiyoloji

Dünyada son otuz yıl içerisinde tiroid kanserinin insidansı yaklaşık 3 kat artmıştır. Tiroid dokusunun kanserleri Amerika Birleşik Devletleri'nde toplumda en sık ortaya çıkan sekizinci kanser, kadınlar arasında ise en sık görülen beşinci kanserdir [50]. Tiroid kanseri, endokrin kanserler içinde en sık görülen endokrin kanser türüdür ve tüm malignitelerin yaklaşık %1'inden sorumludur. Endokrin sistem malignitelerinin %94'ünü meydana getiren tiroid kanseri, endokrin sistem kanserlerine bağlı ölümlerin ise yaklaşık %66'sını oluşturmaktadır [56]. Son yıllarda insidansında ortaya çıkan artışla birlikte tiroid kanserinin 2030 yılında dünya genelinde en sık ortaya çıkan dördüncü malignite olacağı öngörülmektedir [51].

Ülkemizde tiroid kanser prevalansı ile ilgili epidemiyolojik çalışmalara dayalı tam olarak net bir veri ortaya koyulamamakla birlikte, 52.214 kanserli hastanın incelenmesi ile yapılan bir çalışmada tiroid kanserinin %4 oranı ile en sık ortaya çıkan, 10 kanser çeşidi arasında yer aldığı gözlenmiştir [57]. 2015 yılında Türkiye Halk Sağlığı kurumunun açıkladığı verilere göre Türkiye'de diferansiye tiroid kanseri (DTK) insidansı 6/100.000 olarak açıklanmıştır ancak bahsi geçen veri tabanında yer alan bilgiler ICD (Uluslararası hastalık sınıflaması) kodlamasının doğru şekilde yapılmasına bağlı olarak değiştiğinden tiroid kanserinin daha yüksek insidansa sahip olduğu düşünülmektedir [52].

Türkiye’de ise tiroid kanser görülme sıklığı erkeklerde %2, kadınlarda %8,81 olarak bildirmiştir [58]. Kadınlarda erkeklere göre yaklaşık 3-4 kat daha sık olarak diferansiye tiroid kanserlerine rastlanır. Hemen hemen her yaşta görülebilenin yanında, kanser vakalarının üçte ikisinin yaşının 55’den küçük olduğu ve tanı konulduğunda medyan yaşın, kadın hastalarda 40, erkek hastalarda ise 44 olduğu bildirilmiştir [54,55,59]. Olguların %75’ini oluşturan kadınların insidansında yıllar içinde belirgin bir artış meydana geldiği görülmüştür [53].

Tiroid kanseri türleri

Tiroidin normal dokusunda histolojik olarak iki temel parankimal hücre tipi yer almaktadır. Bu hücreler; parafoliküler hücreler olarak da adlandırılan C hücreleri ve folliküler hücrelerdir. Koloid folikülleri çevreleyen folliküler hücreler, iodini konsantre ederek tiroid hormonu üretiminde görev alır. Folliküler hücrelerin hem anaplastik tiroid kanserlerine hem de iyi diferansiye kanserlere dönüşebilme yeteneği vardır. Kalsitonin hormonu üretiminde görev alan hücre tipi olan C hücreleri veya diğer adı ile parafoliküler hücreler ise medüller tiroid karsinomunun temel orijinini oluştururlar.

Tiroid kanserlerinin %90’ını iyi diferansiye kanserler, %5-9’unu medüller kanserler, %1-2 anaplastik kanserler, %1-3’ü lenfoma, %1’den azı ise sarkom ve diğer nadir tümörlerden meydana gelmektedir.

Tiroid kanserleri, folliküler hücrelerden meydana gelen (papiller, folliküler, hürtle hücresi ve anaplastik karsinomlar) ve parafoliküler C hücrelerinden meydana gelenler (medüller karsinoma) şeklinde ayrılır [2].

Tiroid kanserleri arasında en sık ortaya çıkan, tiroid kanseri alt türü olan papiller tiroid kanseridir ve bu alt tür insan toplumlarında görülen tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %85’ini meydana getirir. Diğer diferansiye tiroid kanserlerinden olan folliküler kanser, olguların %10’undan, hürthle hücreli kanser ise %3’ünden sorumludur. Tiroid kanserlerinin <%5’inin nedeni parafoliküler C hücrelerinden köken alan bir diğer alt tür olan medüller tiroid kanseridir. Mortalitesi oldukça yüksek olan anaplastik tiroid kanseri ise nadir olarak ortaya çıkar ve tüm tiroid kanseri vakalarının <%1’inden sorumludur [60,61]. Tiroid kanserinin klinisyenler ve patologlar tarafından kullanılan sınıflamasında iyi, orta, kötü şeklinde

diferansiye olma derecesine göre yapılan sınıflama kullanılır. Alt varyantlar açısından bakıldığında; klasik papiller tiroid karsinomu (KPTK), mikrokarsinom <1cm, kistik, papiller tiroid karsinomunun folliküler varyantı (FVPTK), klasik folliküler tiroid karsinomu (FTK) ve hürtle hücreli (oksifilik, onkositik) karsinomları (HHK) iyi diferansiye olarak sınıflandırılır. Medüller tiroid karsinomu (MTK), papiller tiroid karsinomun sklerozan varyantı, insular karsinom ve papiller karsinomun uzun hücreli varyantı orta diferansiye olarak, anaplastik (andiferansiye) tiroid karsinomu (ATK) ise kötü diferansiye olarak sınıflandırılabilir [2].

Bu sınıflandırmaya ek olarak, tiroid karsinomları başlıca 4 alt tipe ayrılarak da sınıflandırılabilir. Bu alt tipler, papiller tiroid karsinomu (PTK), folliküler tiroid karsinomu (FTK), medüller tiroid karsinomu (MTK) ve anaplastik (andiferansiye) tiroid karsinomu (ATK)'dur [2].

Tiroid karsinomu gelişiminde etkili moleküler faktörler

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında gerçekleşen ilerlemeler ve insan genom projesinin çok büyük aşama kaydedilmesi, karsinogenezin ortaya çıkışına etmen olan kalıtsal yeniden düzenlemelerin daha iyi ortaya koyulmasına ve kanser hastalığının biyolojik belirteçlerinin ortaya çıkarılmasına imkân tanımıştır [63].

Diferansiye tiroid kanserlerinin (DTK) patogenezine bakıldığında kalıtsal ve çevresel faktörlerin patogeneze etkili olabileceği görülmüştür. Beslenmede iyotun (I) eksik ya da fazla kullanılması, süregen inflamatuvar ve iyonize radyasyon maruziyeti bahsi geçen çevresel faktörlerin başında gelmektedir. Kalıtsal olarak ise sinyal yollarında meydana gelen, genetik ve epigenetik değişikliklerin DTK gelişimine neden olabileceği bilinmektedir [64].

Tiroidin normal yapısındaki, normal işleyişe sahip hücrelerin, İyi huylu adenomlara ve buradan iyi differansiye anaplastik tiroid kanserine dönüşümüyle ilişkili olduğu düşünülen bir dizi moleküler etmen tanımlanmıştır [65,73].

Tiroid kanserinde sıklıkla ortaya çıkan kalıtsal yeniden düzenlenmeler Ras mutasyonları, RET/PTK yeniden düzenlenmeleri, PAX8-peroksizom proliferatörle-aktive olan reseptör

gamma (PPAR) füzyon onkogeni ortaya çıkışıdır. Tiroid dışında diğer bazı kanser türlerinde de sık görülen aktive edici Ras mutasyonlarına özellikle FTK ve FVPTK'de sık karşılaşılır. En az 10 farklı kanser türünde RET/PTK yeniden düzenlenmesi tanımlanmıştır. PTK ve bazı benign tiroid adenomlarında çoğunlukla RET/PTK1, RET/PTK2 ve RET/PTK3 görülür. Tiroid adenomlarında ise PAX8-PPAR_FTK yeniden düzenlemeleri görülür [74-77].

Tiroid kanserindeki kalıtsal yeniden düzenlemelerin çoğu onkojenik etkilerini RET/PTK-Ras-Raf-MAP kinaz yolağı üzerinden ortaya çıkarır. Bu yolda ortaya çıkan aktifleşme ile hücre bölünmelerinde ve hücrenin sayıca artışında düzensizlikler ortaya çıkar. İnsanda görülen kanserlerin başlamasında ve kanserin ilerleyen dönemlerinde bu yolda ortaya çıkan aktifleşme, ortak olarak görülen oldukça önemli bir mekanizmadır. MAP kinaz yolağının sürekli aktif olması tümör ortaya çıkışına sebep olur [78]. Aktive edici *BRAF* gen mutasyonlarının keşfedilmesi ile birlikte MAP kinaz yolağını aktive ettiği bilinen kalıtsal yeniden düzenlemelerin dizini genişlemiş ve insanda görülen kanser türlerinde bu yolağın öneminin anlaşılmasına sebep olmuştur [79].

Tiroid kanserlerinin alt türlerinden folliküler neoplazilerde *RAS* mutasyonları ayırıcı özellik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu neoplazilerde sıklıkla *N-RAS* mutasyonları görülmekle birlikte *H-RAS* ve *K-RAS* mutasyonları da görülebilir. Bunlardan daha nadir de olsa bu tümörlerde *EIFIAX* mutasyonu, *BRAF* K601E mutasyonu ve *RET* yeniden düzenlenmesi ortaya çıkabilir. Bunların aksine papiller karsinomlarda ise oldukça sık olarak ortaya çıkan genetik değişiklik *BRAF* V600E mutasyonudur. Bu mutasyonu RET-PTC, NTRK (Nörotropik tirozin kinaz reseptör) ve ALK (anaplastik lenfoma kinaz reseptörü) yeniden düzenlemeleri takip eder [80,81].

Tüm bunlardan hareketle gelecekte genetik değişikliklerin tespitinin, tiroid kanserlerine tanı koymada ve kanserin tedavisinde izlenecek yolu belirlemede başvurulacak önemli bir belirteç olarak kullanılacağı kesin olarak görünmektedir.

2.2.2. Papiller tiroid karsinomu (PTK)

PTK, tiroid kanseri türleri arasında en sık olarak ortaya çıkan tiroid karsinomu türüdür. Tanı alan yeni tiroid kanseri vakalarının yaklaşık %70-75 kadarı papiller tiroid karsinomudur [3]. Çocukluk çağında ve ergenlikte sıklıkla görülen tiroid malignitesi olan PTK, her yaş

grubunda ortaya çıkabilmektedir. Kadınlardaki görülme sıklığı erkeklere göre üç kat daha fazla olan PTK daha çok yirmi ile ellili yaşlar arasında görülür. PTK'de lenfatik yayılım sık görüldüğünden hastalık genellikle bölgesel lenf nodlarında metastaz ve multifokal lezyonlar şeklinde kendini gösterir. Genellikle invaziv olan PTK tümörleri sessiz gidişat gösteren biyolojik davranışlı olmakla birlikte iyi prognoz da gösterirler [84]. İleri yaş olanlarda ve erkeklerde prognozunun kötü olduğu bilinmektedir [83].

Papiller tiroid kanseri varyantları

Malign epitelyal karakterde tümörler şeklinde ortaya çıkan ve folliküler hücre diferansiyasyonu ve gösteren papiller tiroid karsinomlarında farklı patolojik alt tipler/varyantlar bulunur.

Bu varyantlar aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

1. Folliküler Varyant: Papiller tiroid karsinomunun yaklaşık olarak %10 oranı ile en sık ortaya çıkan varyantıdır. Bu varyantın tümör hücreleri küçük-orta boyutta folliküler yapılara sahiptirler. Sitolojik olarak tipik papiller karsinom tümör hücresi özelliği sergilerler [85].

Folliküler varyant papiller karsinomu, klasik papiller karsinomdan daha küçük yapıdadır ve daha düşük oranda bölgesel lenf nodu metastazı riskine sahiptir ancak genel sağ kalım ve rekürrens oranları klasik papiller karsinom ile aynıdır [85,86].

2. Tall-cell Varyant: Tümör hücrelerinin sitoplazması onkositik yapı gösteren bu varyantta hücre boyları hücre enlerinden neredeyse iki üç kat daha fazladır. Papiller karsinomdan daha büyük çapa sahip olan tümörler yüksek mitotik aktivite ve vasküler invazyon gösterirler. Klasik papiller karsinomdan daha fazla saldırgan bir ilerleyişe sahip olan tall-cell varyant (TCPTK) papiller kanserlerin yaklaşık %1'i kadarını oluşturur. Yaşlılarda daha sık ortaya çıktığı bildirilmiştir [85,87].

3. Diffüz Sklerozan Varyant: Çocuk ve genç yaş grubunda daha sık ortaya çıkar. Tiroid dışı yayılım gösterebildiğinden ve uzak metastazı sık ortaya çıktığından oldukça saldırgan bir alt tiptir. Çocukluk evresinde ortaya çıkan papiller tiroid karsinomlarının diğer varyantlarına kıyasla prognoz daha ciddi seyreder [84].

4. Papiller Mikrokarsinom: Tümör çapı 1 cm ve altında olan kitlelere mikrokarsinom denir ve prognozu genellikle iyi seyreder [87].
5. Kolumnar Varyant: Bu alt tip mikroskopta belirgin köşeli hücreler şeklinde kendini gösterir. Hem medikal hem de cerrahi olarak oldukça agresif tedavi edilmesi gereken bu varyant oldukça kötü prognoza sahiptir. Kadınlara oranla erkek cinsiyette görülmesi daha sıktır ve %90 gibi bir oranda uzak metastaz ile seyreder[88].
6. Trabekuler/Solid Varyant: Tiroidin oldukça az görülen benign bir neoplazmıdır. Çocukluk çağında daha sık görülen bu varyant uzak metastaz yapma eğilimindedir [89].

Papiller tiroid kanserlerinde onkogenler

Tiroid dokusunda ortaya çıkan kanserlerin yaklaşık %90'ında en az bir patogenetik lezyon bulunduğu bilinmektedir. Bu genler genellikle MAPK-ERK ve PI3K-AKT olarak iki sinyal yolağında fonksiyonu olan proteinleri kodlar. Tiroid kanserlerinin bazı varyantlarında ise bu iki yolak dışında birtakım spesifik farklı yolakların olduğu da tespit edilmiştir. Bu yolakların önemli olanlarından bazıları PAX8-PPAR γ füzyonu, THADA gen füzyonu, EIF1AX, TP53 ve TERT promoter mutasyonlardır [90,91].

Papiller tiroid kanserleri taşıdıkları gen mutasyonları ve genlerde meydana gelen yeniden yapılanmalar ile MAPK aktivasyonu yoluyla hücre bölünmesini tetikler. RET ve NTRK1 tirozin kinazların yeniden yapılanması, *BRAF* ve *RAS* mutasyonlarının aktifleşmesini sağlayarak; MAPK aktivasyonuna neden olur [92].

Papiller tiroid kanserleri; transmembran tiroid kinazın iki farklı geni olan RET ve NTRK1'in yeniden yapılanmasından meydana gelmektedir. Bu değişim sonucunda ortaya çıkan şimerik proteinler; tirozin kinaz aktivitesinin oluşması yolu ile malign fenotipin gelişimine neden olur. Bu genlerin somatik olarak yeniden yapılanması sonucunda yeni genetik materyal, genin tirozin kinaz kısmının 5' sonuna eklenerek tirozin kinaz aktivitesinde yapısal artışa neden olur ve bunun sonucunda büyüme yolaklarının aktivasyonu ile papiller tiroid kanseri ortaya çıkar [93,94].

En az 6 adet şimerik *RET/PTC* ve tirozin kinaz (*TRK*) geni mevcuttur. Bu genlerin klinik olarak önemleri oldukça benzerdir ancak bu genetik değişikliklere sahip olan papiller tiroid kanserleri, sahip olmayanlara göre oldukça saldırgan seyreder [95-97].

Papiller tiroid kanserinin patogenezinde rol alan *BRAF* geni, *RAF* geninin bir izoformudur. Bu genin folliküler karsinom ve nodül oluşumunda rolü yoktur [98]. Serin-treonin kinaz, *RAF/MEK/MAPK* olan *RAF* proteinlerinin sinyal yolağını aktive eder [99]. *BRAF* geni mutasyonlarından biri olan T1799A mutasyonu malign melanomlarda %50 oranında, kolon kanserinde oldukça küçük bir yüzde oranında ortaya çıkarken, papiller tiroid kanserinde % 29 ila 69 oranında saptanmıştır [92,100]. Diğer bir *BRAF* mutasyonu olan *V600E*'nin oluşmasıyla meydana gelen protein, bazal kinaz aktivitesini artırarak ve wild tip *BRAF*'dan NIH3T3 hücrelerini daha etkin hale getirir ve bunun sonucunda da bu mutasyonun eksprese olduğu hücrelerde papiller tiroid karsinomu ortaya çıkar [101].

V600E mutasyonu *BRAF* 'ın en sık ortaya çıkan, yayılımcı tümör büyümesi ve folliküler varyant ile yakından ilişkili olan mutasyondur. Bu mutasyona sahip olan hastalarda hastalığın seyri olmayanlara göre daha kötüdür ve bu hastalarda hastalığın yeniden ortaya çıkarak nüks riski daha fazladır [102].

BRAF mutasyonları olan hastalarda ekstratiroidal yayılım ve lenf nodu metastazı daha sık ortaya çıkar ve bu hastalar ilk cerrahi müdahale esnasında daha ileri evrelemeye sahiptirler. Hastalığın seyrinin ortaya koyulmasında konvansiyonel histolojik değerlendirme oldukça etkilidir ancak bazı lenf nodu metastazları sadece *BRAF* mutasyonu varlığında ortaya çıkmaktadır [96].

Tiroid hücre kültürlerine seçici *BRAF* inhibitörlerinin eklenmesi, *BRAF* mutasyonuna sahip hücrelerin inhibisyonuna neden olur. Bu da *BRAF* mutasyonunun papiller karsinom tedavisinde rol alacağını göstermektedir [104,105].

Bunun dışında iyi diferansiye tiroid kanser riskini arttıran genetik anomalilere bakıldığında, bu anomalilerin geniş populasyon çalışmalarında klinik olarak orta derecede önemli fakat istatistiksel olarak anlamlı üç farklı tek nükleotid poliformizmi saptanmıştır. Bunlardan; MikroRNA-146a prekürsörü ile AG/C heterozigotluğu papiller karsinom oluşumuna yatkınlık yaratır [91]. Bu polimorfizm mikroRNA sekanslarını değiştirerek mikroRNA fazla

ekspresyonunu indüksiyonuna ve sonuç olarak da yeni mikroRNA formları ortaya çıkar. Bu mikroRNA formları hedef gen ifadelerini değiştirir. Tek nükleotid polimorfizmi çeşitlerinden olan 14q13.3'deki NKX2-1 (TTF1)'e, 9q22.33'deki FOXE1(TTF2)' ye yakındır. Her iki polimorfizm de (FOXE1 ve NKX2-1) tiroid hücrlerinde gen regülasyonunu sağlar [92,93]. Mi-RNAlar 3'bölgesinde özgül hedeflere bağlanma yolu ile gen ekspresyonunu düzenleyerek farklı bazı dokularda tümörögenezin ortaya çıkmasına neden olur. Papiller karsinomda miR-221, miR-222, miR146 gibi bazı miRNAlar regüle olarak tümörögenezise neden olur [94].

Papiller tiroid karsinomu patogenezi

PTK etiyojisi açıkça aydınlatılamamısına rağmen PTK oluşumunu tetikleyebildiği düşünölen bir takım etkenler tanımlanmıştır. Bunlar;

İyotun aşırı tüketilmesi: Hayvanlar ile yapılan deneylerde aşırı iyot alımının PTK ortaya çıkmasına neden olduğu gözlemlenmiştir Beslenmede iyot miktarının artırılması sonucu PTK'de artış gözlenmiştir.

Radyasyon: Yetişkin ve çocuklarda boyun bölgesinin dışarıdan radyasyona maruz kalması halinde ilerleyen dönemde PTK görölme sıklığı artmaktadır. Japonya'da atom bombası maruziyetinden sonra bu bireylerde PTK insidansı artmıştır. 1986 yılında Ukrayna'da bulunan Çernobil nükleer santralinde meydana gelen kaza sonrasında bu bölgede yaşayan çocuklarda yüksek oranda PTK ortaya çıktığı görölmüştür. Her ne kadar radyasyonun PTK oluşumuna katkısı olsa da, tedavi amaçlı kullanılan radyoaktif işaretili iyot, tümör gelişimi riskinde her hangi bir artışa neden olmamaktadır.

Genetik faktörler: Epidemiyolojik olarak yürütölen çalışmalarda tiroid tümörü taşıyan bireylerin birinci derece akrabalarında PTK gelişimi riskinin 4-10 kat daha arttığı görölmüştür. Yapılan çalışmalarda tek yumurta ikizlerinde de bununla uyumlu sonuçlar ortaya konulmuştur. Çalışmalarda gözlemlenen bütün olguların yaklaşık %5'inden PTK' nin ailevi bir formu sorumlu tutulsa da bu durumdan sorumlu olan genler henüz ortaya konulamamıştır.

Somatik mutasyonlar: PTK gelişimi riski ailesel adenomatöz polipozisli hastalarda yüksektir. Çernobil kazası sırasında radyasyon maruziyeti yaşayan çocuklarda görülen tümörlerin %60'ında 10. kromozom üzerindeki (10q11.2) RET onkogeninde yeniden düzenlenmelerle ortaya çıkan bir mutasyon görülmüştür. Bu mutasyon PTK'de de yaygın olarak görülür. Tiroidin dışarıdan radyasyona maruz kalması sonrası da aynı mutasyon oluşur. Bu mutasyonlar RET'in tirozin kinaz bölgesinin çeşitli genlerle füzyona uğramasına ve RET/PTK füzyon onkogenlerin oluşumuna neden olur [83].

Papiller tiroid karsinomunda prognostik parametreler

Yaş: En önemli prognostik faktörlerden biridir. 50 yaşın üzerindeki vakalarda, daha genç yaşta olanlara kıyasla prognozunun daha kötü olduğu görülür. Papiller karsinomdan kaynaklı olarak ortaya çıkan ölümlerin oldukça fazla bir bölümünün 40 yaşından sonraki olgularda olduğu bildirilmektedir.

Cinsiyet: Erkeklerde hastalığın prognozunun kadınlara oranla daha kötü olduğunu bildiren araştırmalar bulunmaktadır. Ancak bazı çalışmalarda ise cinsiyetin prognoz üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Bu bağlamda cinsiyetin prognoza etkisinden bahsetmek güçtür.

Tiroid dışı yayılım: Prognozu olumsuz yönde etkileyen etmenlerin başında gelmektedir. Makroskopik olarak tiroid dışına yayılım gösteren vakalarda, hastalığın prognozu yayılım göstermeyenlere kıyasla daha kötü seyretmektedir.

Mikroskopik alt tipler: Papiller mikrokarsinomlar, klasik tip, foliküler varyant ve enkapsüle varyantın prognozları, bunların dışındaki alt türlere göre daha iyidir.

Tümör çapı: Prognozu ile tümör çapı arasında ters orantı mevcuttur. Yani tümör çapı küçüldükçe prognozu iyileşir.

Multisentrisite: Birden fazla tümör odağına sahip olgularda, metastaz oranının yüksek ve sağ kalım süresinin de daha kısa olduğu görülmüştür.

Uzak metastaz: En sık olarak akciğerlere ve iskelet sistemine metastaz görülür. Hastalıkta uzak metastazın ortaya çıkması prognoz üzerine olumsuz etkiye sahiptir.

Radyasyon: Daha önce radyasyon hikâyesi olan olgular ile radyasyon hikâyesi olmayan olgular arasında prognoz açısından belirgin bir fark ortaya koyulamamıştır [111].

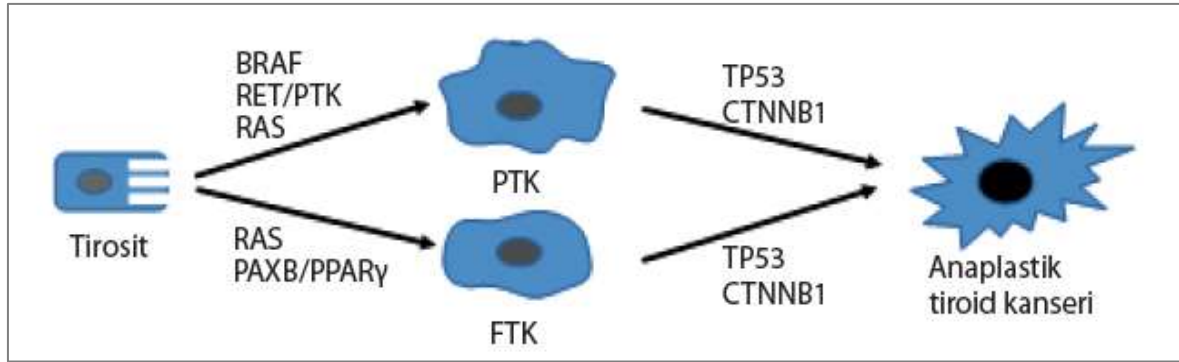
2.3. Tiroid Kanserinde Moleküler Patogenez

Tiroid kanserlerinde tümör oluşumuna neden olan hücrelerin ve karsinogenez gelişim mekanizmalarının ortaya çıkarılması ile daha kanser başlamadan hücresel basamakların evreleri önceden ortaya çıkarılarak kanserin tanı ve tedavisinde yeni birtakım bakış açıları geliştirilebilir.

Diferansiye tiroid karsinogenezi , ‘çok basamaklı karsinogenez’, ‘fetal hücre karsinogenezi’ ve ‘kanser kök hücre karsinogenezi’ olmak üzere üç farklı hipotez ile açıklanmaktadır.

2.3.1. Çok basamaklı karsinogenez

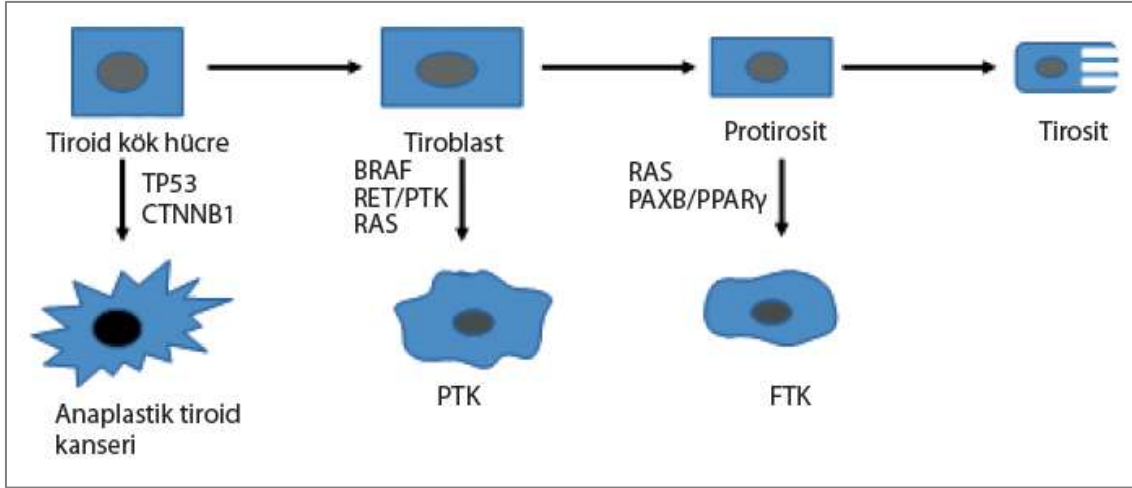
Çok basamaklı karsinogenez hipotezinde hücre içi yollara (özellikle MAPK yolağına) etki eden genetik yeniden düzenlemelerinin karsinogeneze neden olduğu ifade edilmektedir. Tirositlerde (tiroid folikül hücreleri) meydana gelen genetik mutasyonlar sonucundan PTK ve FTK gelişmekte, gelişen bu kanserlere eklenen diğer bazı kalıtsal yeniden düzenlemelerle görülen dediferansiyasyon ortaya çıkması ile de anaplastik ve az diferansiye kanserler oluşmaktadır. Bu mekanizmaya göre PTK *RET* geninde ve *BRAF V600E*’de ortaya çıkan mutasyonlardan sonra, FTK ise folliküler adenomlardan sonra oluşmaktadır. Özetle bu hipotez, bazı kalıtsal yeniden düzenlemeler ve çevresel unsurların etkisi ile PTK ya da FTK gelişebildiğini ve gelişen bu tümörlere diğer bazı genetik mutasyonların eklenmesi ile de az diferansiye tiroid kanserleri ya da tiroidin anaplastik kanserlerinin oluştuğunu savunmaktadır (Şekil 2.2) [112-114].



Şekil 2.2. Çok basamaklı karsinogenez [114]

2.3.2. Fetal hücre karsinogenez

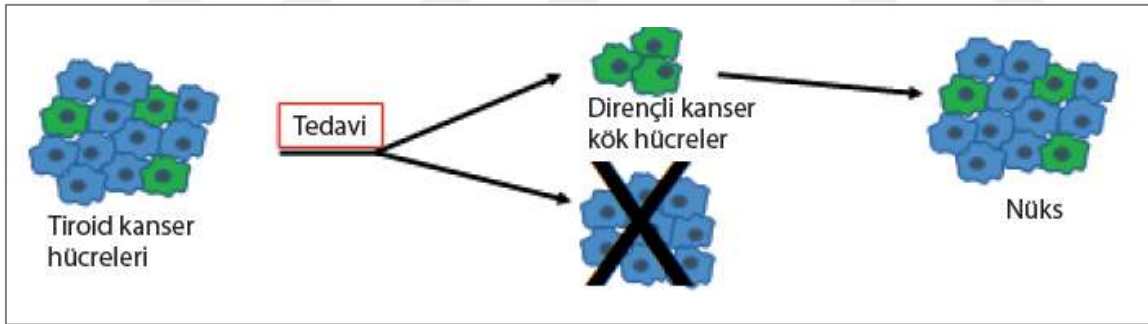
Bu hipoteze göre tiroid kanserleri çok adımlı karsinogenezin aksine tiroisitler yerine tiroidin fetal hücre kalıntılarından gelişmektedir [115]. Buna göre fetal tiroid hücrelerinin anormal gelişmesi ile tiroid kanserleri ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar tiroidin fetal hücreleri ile ilgili yeterli veri olmasa da tiroid kök hücreleri olarak adlandırılan bazı hücrelerin tiroid gelişiminde görev aldığı düşünülmektedir. Emriyonal dönemin yaklaşık onuncu haftasından itibaren tiroblastlara dönüşmeye başlar ve tiroglobulin (TGB) eksprese ederler. Tiroblastların boyunun ön tarafına doğru göç etmesi ve burada çoğalması ile tiroid folikülleri oluşturarak protirositlere dönüşürler. Daha sonra tirositlere dönüşen bu hücreler tiroid hormonu üretmeye başlar. Bu gelişim basamaklarını gösteren fetal tiroid hücrelerinde diferansiyasyona engel olan olası bir unsur kanserin ortaya çıkmasına neden olabilir. *BRAF* ve *TP53* genlerinde görülen mutasyonlar RET-PTK ve PAX8-PPAR γ genetik yeniden düzenlemeleri ile ortaya çıkan değişiklikler proliferatif avantajlara neden olmakta ve fetal tiroid hücrelerinin farklılaşmasının önüne geçerek onkojenik durumların ortaya çıkması ile karsinogenez açıklanmaktadır (Şekil 2.3) [114,116].



Şekil 2.3. Fetal hücre karsinogenez [114]

2.3.3. Kanser kök hücre karsinogenez

Bu hipoteze göre tümör geliştirme ve progresyon yeteneğine sahip yalnızca bir grup hücre bulunmaktadır. Bu hücreler genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda fenotipik olarak farklı kanser türlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Şekil 2.4) [114,117].



Şekil 2.4. Kanser kök hücre karsinogenez [114]

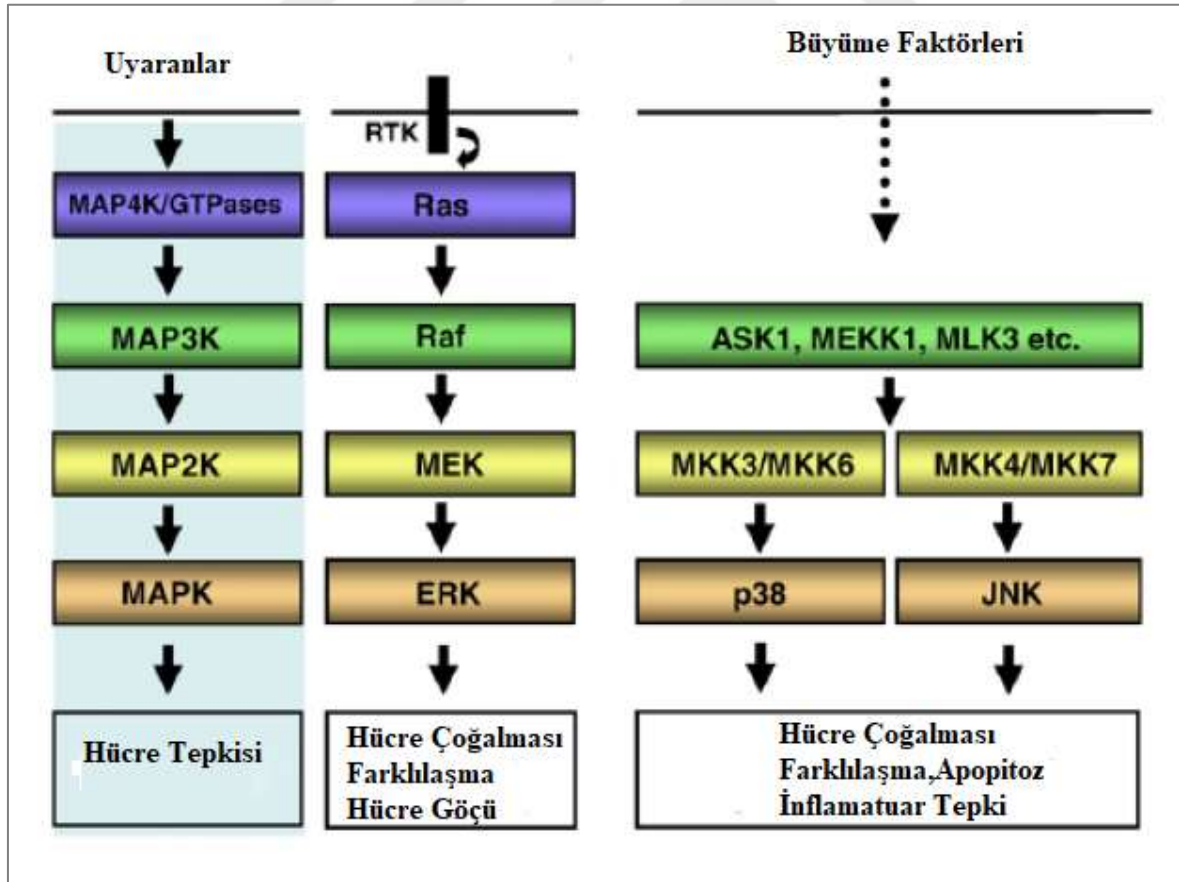
2.4. Mitojen Tarafından Aktive Olmuş Protein Yolağı (*Mapk*) ve *Braf* Geni

Tiroid kanserinde moleküler patogenezi anlayabilmek adına yürütülen birçok araştırmada patogeneizde görev alan mekanizmaların başında Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolağında meydana gelen yeniden düzenlenmelerin etkili olduğu görülmüştür [118].

Büyüme faktörleri ve diğer bazı hücre zarı sinyal molekülleri ile aktif hale gelen MAP Kinazlar, çekirdeğe transloke olan serin/ treoninin protein kinaz ailesindendir [119]. MAPKlar mitojenik sinyal yolları ile etkileşim halindedirler. ERKler (ekstraselüler

sinyalle düzenlenen kinaz), P38 ve JNK (cJun NH2-terminal kinaz) olarak üç alt grubu olan MAP kinazlar çekirdeğe giderek bazı transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasına engel olurlar.

RAF ve MEK (MAP kinaz veya ERK kinaz) ERK aktivasyonuna aracılık eden iki protein kinazdır. Raf'la etkileşen ve GTP bağlayan bir protein *Ras*'ın (Rat sarkoma protoonkogen) aktivasyonunu hücre zarında yer alan bir büyüme faktörü reseptörünün uyarılması ile sağlar. Raf'la meydana gelen etkileşimden sonra MEK fosforile ve ardından aktive olur. Aktive olan MEK fosforilleme ile ERK'i aktive eder. ERK ise çekirdek ve sitozolde bulunan hedef proteinleri fosforiller. Sitokinler, UV, JNK ve p38 MAPK aktivasyonuna neden olan faktörlerdir. Bu aktivasyona *Ras*'dan farklı olarak, GTP bağlayan küçük proteinler aracılık eder. Mitojenlerin dışında hipoksik, genotoksik, ozmotik veya oksidatif hücrel stres gibi bazı uyarılar da p38, MAPK ve JNK'nin aktive olmasına ve tüm bunların sonucunda da hücre büyümesine alternatif hücre ölümü tetiklenmesine neden olabilir(Şekil 2.5) [119-121].



Şekil 2.5. MAPK (ERK, JNK ve P38 alt grupları) sinyal yolları [119]

2.4.1. MAPK yolağı

Hücre zarında bulunan bir reseptörden hücre çekirdeğine ileti taşınmasını sağlayan MAP-ERK yolağı tiroid dokusunda ortaya çıkan kanserlerin farklı birçok formunda aktif role sahiptir. Hücre proliferasyonu ve tümörlerin ortaya çıkıp gelişmesinde önemli işleve sahip olabilen bu yolak, büyüme faktörleri, mitojenler ve proinflamatur sitokinler gibi farklı uyarıcılar sonucunda aktif hale gelebilir. Bahsi geçen bu ve benzeri uyarıcıların etkisi altına giren MAPK yolağının uyarılması sonucunda hücrede proliferasyon, diferansiyasyon, adezyon, migrasyon ve apoptozis ile ilişkiye sahip birtakım protein aktivasyonları görülür, tüm bunların sonucunda ise hücrede meydana gelen transkripsiyon mekanizması etkilenir. Tiroid kanserlerinin erken evrelerinde MAPK yolağının *BRAF* ve *RAS* mutasyonları ya da RET/PTK yeniden düzenlenmeleri gibi birçok mutasyon ile uyarılabileceği tespit edilmiştir. MAPK yolağında ortaya çıkan bu mutasyonlar tiroid dokusunda görülen tümörlerin gelişimini PTK yönünde kaydırır [122].

Mitojen aktive olmuş protein kinaz (MAPK) yolağı, mitotik hücre bölünmesinde, büyüme sinyallerine karşı oluşturulan hücrel cevabın düzenlenmesinde görev alır. Bu yolakta RAS, RAF, MEK ve ERK adı verilen proteinler yer almaktadır. Hücrenin birçok yaşamsal fonksiyonun düzenlenmesinde önemli göreve sahip olan bu proteinler, hücreye gelen sinyalin çekirdeğe iletilmesinde önemli bir işleve sahiptir [111].

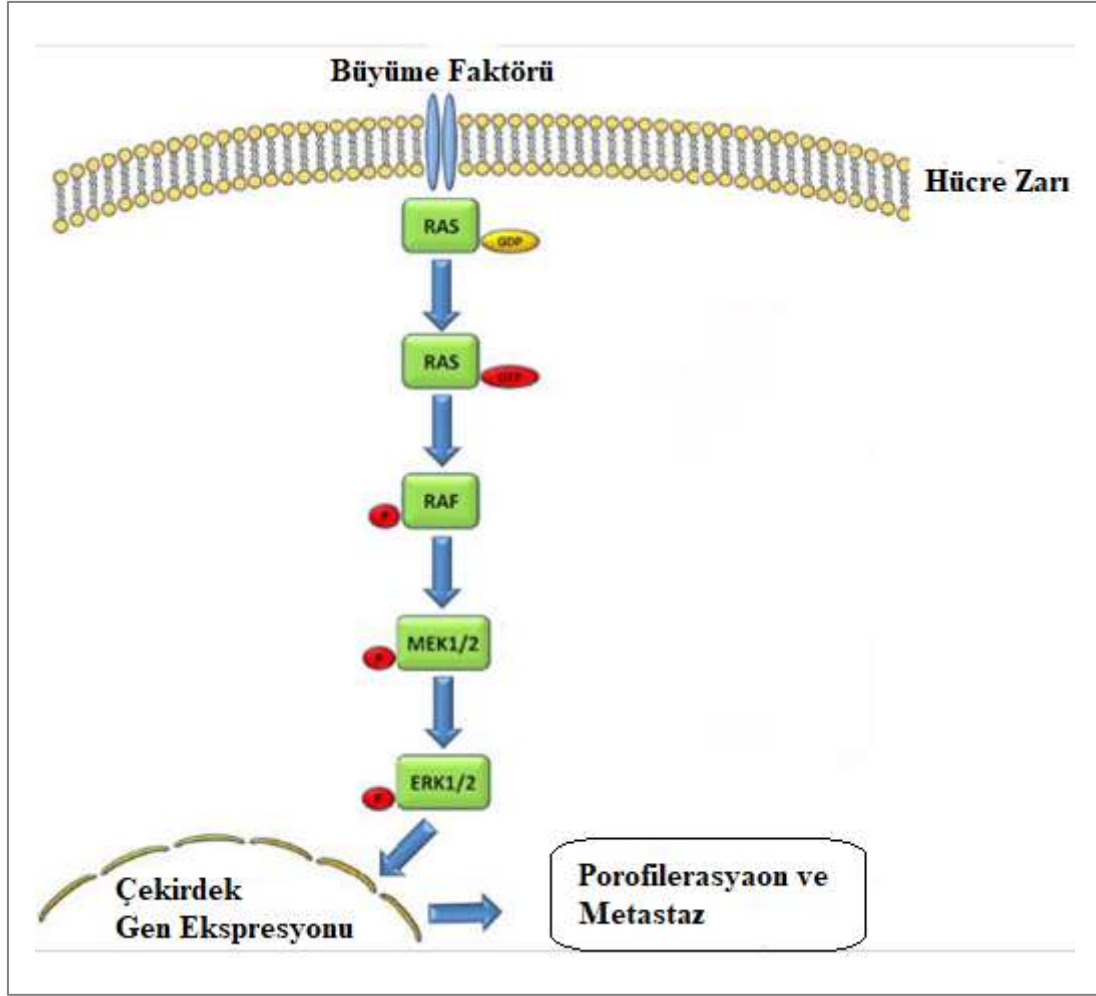
RAS proteinleri hücre içerisinde oldukça önemli bir sinyal ağını içine alan küçük guanozin bağlı GTPazlardır. RAS genleri bir multigen ailesi olarak, *HRAS*, *NRAS* ve *KRAS* genlerinden oluşur. Bahsi geçen bu genler büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazlara bağlanmasından sonrası aktive olurlar. *RAF* (*ARAF*, *BRAF* ve/veya *CRAF*) aktivasyonu, RAS aktivasyonun gerçekleşmesinin ardından meydana gelir. RAF proteini MEK1 ve/veya MEK2'yi fosforile eder ve aktif hale getirir. Bu aktivasyon gerçekleşmesinin sonucunda ise ERK1 ve/veya ERK2 aktivasyonu meydana gelir. ERK1/2 kinazları, membran proteinlerini, transkripsiyon faktörlerini ve nükleer bileşenleri içine alır ve bu proteinler hücre döngüsü, hücre farklılaşması ve hücrel büyümenin kontrolü gibi oldukça önemli görevlerde rol alırlar [123].

MAPK sitoplazmik substratlarını ve/veya çekirdekteki transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve böylece hücrenin biyolojik cevabının oluşmasına etki

eder. MAPK yolağı; reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz zinciri olarak çalışır. Sinyalin iletimi RAS aktivasyonu ile başlar ve arkasından son MAPK (MAP kinaz) aktivitesi gerçekleşmesi ile sona erer [124].

Bu yolakta meydana gelen aksaklıklar, hücrelerin kanserleşmesinde oldukça fazla bir etkiye sahiptir. İnsanlarda görülen kanserlerde en sık mutasyona uğramış onkogen *RAS* geninde görülür. Bunlardan, *KRAS* mutasyonları akciğer kanserinde ve pankreasın kanserlerinde değişen oranlarda ortaya çıkmaktadır [125,126]. Yumurtalıkların düşük dereceli seröz karsinomlarının %41'inden herhangi bir mutasyon olmaksızın MAPK yolağının aktive olması sorumludur [127].

İnsanlarda ortaya çıkan kanserlerin yaklaşık olarak %15'inde *RAS* onkogeninde meydana gelen mutajenik bir değişiklik rol almaktadır. RAS bağlanması ile regule olan *BRAF* geni sitoplazmik bir serin-treonin kinazı kodlar [111,128,129]. MAPK yolağı ile *BRAF* aktivasyonunu hücre sayısında düzensiz artışı ortaya çıkarmakta ve apoptozis inhibisyonunda rol oynamaktadır (Şekil 2.6)[130, 139].



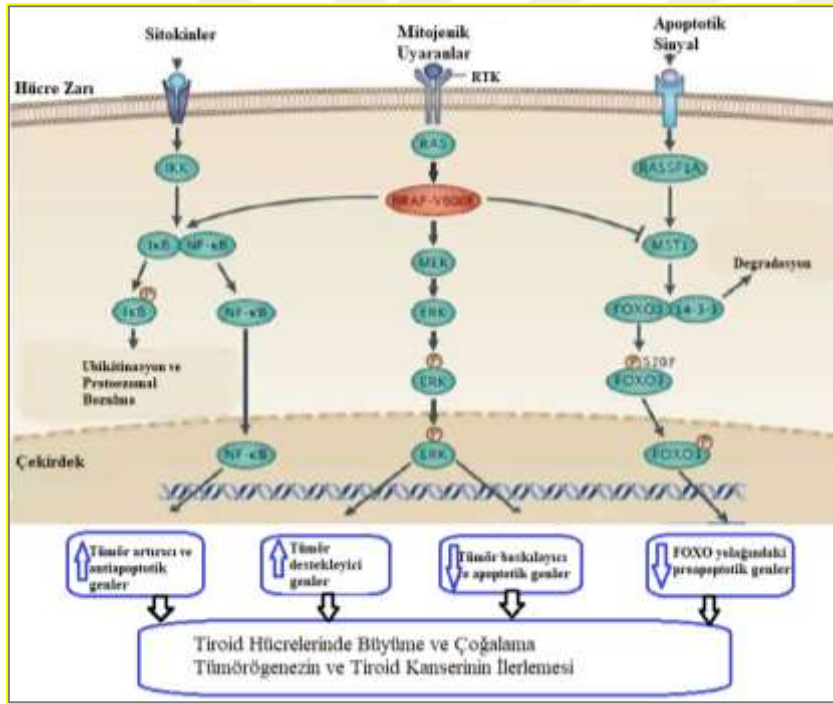
Şekil 2.6. MAPK yolağı (Büyüme faktörleri hücre zarında reseptör olan tirozin kinazlara bağlanır ve Ras proteinininin aktifleşmesine neden olur. Aktifleşen Ras proteini, bu yolda sırayla Raf, MEK1/2 ve ERK1/2 protein kinazları fosforillenerek aktifleştirir. Tüm bunların sonucunda da hücrelerde proliferasyon ve hatta en nihayetinde metastaz gelişebilir) [61]

MAPK yolağındaki yeniden düzenlenmeler tiroid dokusunda ortaya çıkan kanserlerin gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynar.

MAPK yolağında yer alan bir sinyal ileti yolağı olan nükleer faktör kB (NFkB) sinyal ileti yolağı sitokinler gibi hücre dışı uyarılar tarafından aktive olur. Bu aktivasyon ile inhibitör kB(IkB)'nin fosforilleşmesi gerçekleşir. Fosforilleşen IkB, kompleks yaptığı NF-kB' den ayrılarak ubiquitinasyona ve proteozomal degradasyona uğrar. IkB'den ayrılarak serbest kalan NF-kB çekirdeğe giderek burada tümör artırıcı ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda artışa neden olur. MAP kinaz sinyal ileti yolağında yer alan diğer bir yolak ve hücre zarında bulunan bir reseptör olan tirozin kinaz (RTK) yolağı hücre için mitojenik etkiye sahip bir uyarının etkisi ile aktive olur. Bu aktivasyon ile ortaya çıkan sinyal sırayla

RAS, RAF, MEK ve son olarak ERK'e iletilir. Fosforillenme ile aktif hale gelen ERK çekirdeğe giderek burada tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunda azalmaya neden olurken, tümör artırıcı genlerin ekspresyonunda ise artışa neden olur. MAPK yolağında yer alan, RASSF1A-memeli STE20-proteinkinaz 1 benzeri (MST1) çatal bağlantı kutusu 03 (FOXO3) yolağında ise hücre dışında yer alan apoptotik uyarıcılar tarafından RASSF1A'nın ardından da MST1'in aktivasyonu gerçekleşir. Aktive olan MST1 ile de FOXO3 fosforillenmesi meydana gelir. Fosforile olan FOXO3 çekirdeğe giderek burada FOXO yolağındaki proapoptotik genlerin ekspresyonunda artışa neden olur.

MAPK sinyal ileti yolağında bu şekilde gerçekleşen olaylarla birlikte tiroid hücrelerinin proliferasyonunda artış, tümörögenез ve en nihayetinde tiroid dokusunda kanserleşme meydana gelir (Şekil 2.7) [64].

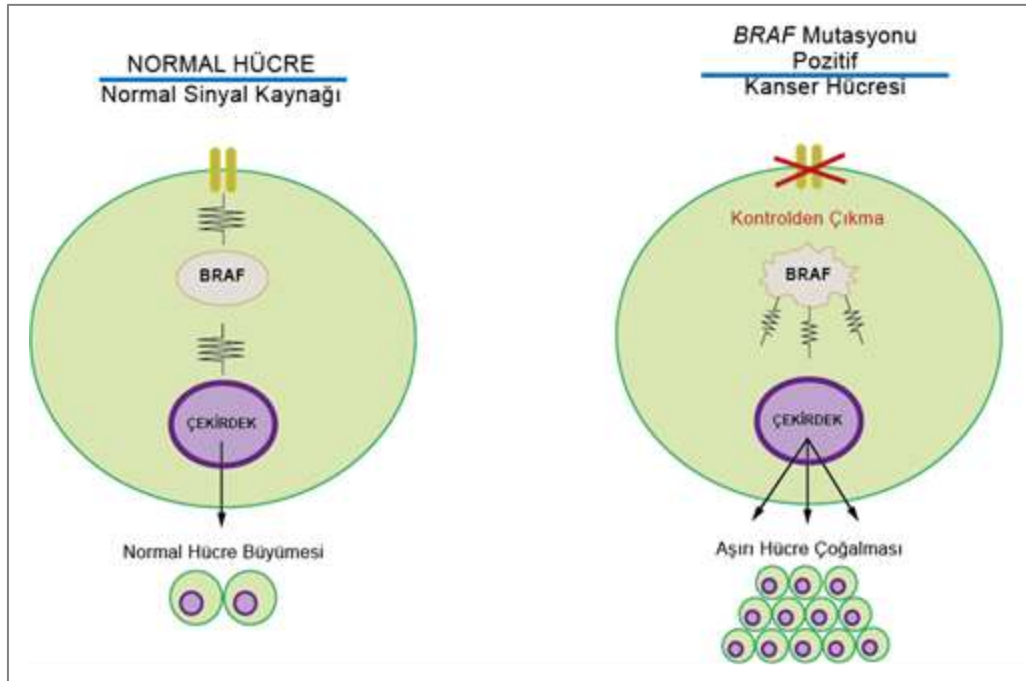


Şekil 2.7. MAPK sinyal ileti yolaklarının tiroid kanserindeki etkisi [64]

2.4.2. *BRAF* geni ve mutasyonu

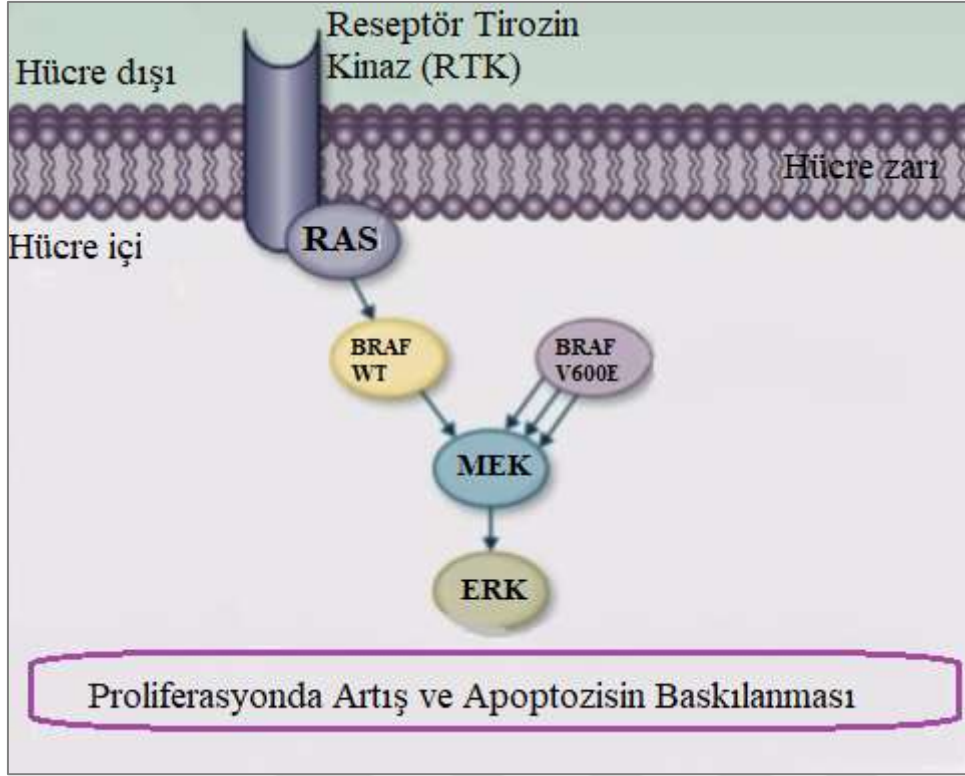
Serin treonin kinazların RAF ailesinden bir protoonkogen olan *BRAF* (v-Raf fare sarkomu viral onkogen homoloğu B1) geni 7. kromozomun uzun kolunda 7q34 pozisyonu üzerinde yer alır ve 18 tane ekzon içerir. *BRAF* geni *RAS*'ın hücre zarına bağlanarak aktifleşmesinde rol oynar. *BRAF* geninin eksprese ettiği *BRAF* proteini hücre büyüme döngüsünde etkilidir

ve dışarıdan gelen kimyasal mesajların hücrenin çekirdeğine iletilmesine yardımcı olan bir proteinin yapımını sağlar. Bu protein aynı zamanda birkaç önemli hücre fonksiyonunu kontrol eden RAS / MAPK yolağı olarak bilinen sinyal yolağının da bir parçasıdır. RAS / MAPK yolağı, hücrelerin büyümesini, bölünmesini düzenlemenin yanında hücrelerin farklılaşmasını, hücre hareketini (göç) ve hücrelerin kendi kendini yok etmesini (apoptozis) yürütmek için olgunlaşma sürecini düzenler. Bu yolak boyunca gerçekleştirilen kimyasal sinyal iletimi, doğumdan önce normal gelişim için de vazgeçilmezdir. Onkogenler olarak bilinen gen sınıfına ait olan *BRAF* 'da meydana gelen mutasyonlar, normal hücrelerin kanserleşme potansiyelinin ortaya çıkmasına neden olur (Şekil 2.8)[79].



Şekil 2.8. *BRAF* mutasyonu ve kanserleşme [79].

BRAF geninde sık olarak ortaya çıkan *V600E* mutasyonu; genin 1799. pozisyonunda timin nükleotidinin adenin nükleotidine dönüşümüyle sonuçlanan bir mutasyondur. Bu nükleotid değişimi sonucunda kodon 600 'de valin amino asidi (V) yerine glutamik asit (E) amino asidi kodlanır ve böylece mutasyon meydana gelmiş olur [133]. Bu mutasyonun ortaya çıkışı ile B-Raf sürekli aktif hale gelir ve bunun sonucunda da yolağın aktivasyonu ve hücresel proliferasyon ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.9) [134, 135].



Şekil 2.9. *BRAF* tarafından aktive edilen hücre içi sinyal yolları [135]

BRAF geninde var olan mutasyonlar ile ortaya çıkan ve aynı zamanda bir serin treonin kinaz olan B-Raf proteini çoğu malignitenin etiyolojisinde rol almaktadır. Malign melanom hastalarında *BRAF* gen mutasyonun özellikle glutamik asit ile valin değişiminden kaynaklanan *V600E* mutasyonu %40-60'ında görülmektedir. Ayrıca *BRAF* mutasyonları kolorektal ve over kanserlerinde de görülür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda papiller tiroid kanserlerinin yaklaşık %29-83'ünde *BRAF* mutasyonlarının varlığı saptanmıştır [79]. *BRAF*, ileri derecede malign kolorektal kanserlerde yaklaşık olarak %15'inde ortaya çıkar [136]. Ayrıca pleomorfik ksantoatsrositomlarda yaklaşık % 66 oranında, safra yolları kanserlerinde, akciğer adenokarsinomlarında % 4,6 oranında, bazı yumurtalık tümörlerinde % 13 oranında *BRAF* mutasyonu olduğu tespit edilmiştir [137,138].

Tirod dokusunda ortaya çıkan kanserlerde meydana gelebilen nokta mutasyonları, kromozomlarda görülen yeniden düzenlemeler ile insersiyonlar ve delesyonlar *BRAF* aktivasyonunun görülmesine neden olabilir. *BRAF V600E* mutasyonu daha çok PTK 'de görülen ve oldukça güçlü bir tanısal belirteç olma özelliğine sahip bir nokta mutasyondur. Özellikle PTK'nin tall cell varyantında yaklaşık %90'dan daha fazla sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir. Bu mutasyon her ne kadar PTK için tanısal öneme sahip olsa da yapılan bazı

çalışmalarda, tümör hücrelerinin bazılarında *BRAF* mutasyonu varken bazılarında bulunmadığı ve mutasyon açısından intratümöral heterojenite olduğu tespit edilmiştir [61]. Yapılan çalışmaların çoğunda *BRAF V600E* mutasyonunun tiroid kanserinde lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve mortalite gibi hastalığın kötü prognozu ve kötü klinik ve patolojik sonlanımlarla ilişkisi olduğu tespit edilmiş olsa da *BRAF* mutasyonu ile tüm bunlar arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını bildiren çalışmalarda vardır [140-143].

2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Temelinde uygun laboratuvar ortamında nükleik asitlerin çoğaltılması (*in vitro* klonlama) mantığına dayanan PZR; Kary Mullis, Henry A. Erlich ve Randall K. Saiki tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde 1985 yılında ortaya konulan bir tekniktir. Geliştirdikleri bu teknik ile Kary Mullis, 1993 yılında verilen Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür [166].

2.5.1. PZR yönteminin prensipleri ve aşamaları

PZR tepkimeleri, ayrılma (denatürasyon), bağlanma (annealing) ve sonlanma (extension) olmak üzere üç aşamadan meydana gelir. İlk aşama olan denatürasyonda yüksek sıcaklıkla DNA'nın iki ipliğinin birbirinden ayrılması (denatürasyon) gerçekleşir, ardından ikinci aşamada sentetik oligonükleotidler hedef DNaya bağlanır (annealing). Bağlanmadan sonra üçüncü aşamada ise DNA'nın uzaması (polimerizasyon ve çift iplikli DNAların sentezlenmesi) ve bu üç aşamanın belirli sayıda ard arda döngüsel olarak tekrarlanması ile tepkimeler sona erer. Bütün bu tekniğin otomasyonu, sıcaklığı sıcaklığı 4-100°C' arasında değiştirebilen ve thermal cycler (PZR makinesi, DNA amplifikatörü) olarak isimlendirilen cihazlar tarafından gerçekleştirilebilmektedir [167].

2.5.2. Realtime PZR

Realtime PZR yöntemi, floresans bir ışımının nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak ortaya çıkması ile çoğalmadaki artışın kantitatif (nicel) olarak ölçülebildiği bir PZR yöntemidir. Realtime PZR, oldukça kısa sürede sonuç verilebilmesi, tüpler açılmadan sonuca ulaşılabilmesi nedeni ile kontaminasyon (bulaş) riskini en aza indirmesi ve elektroforeze gerek kalmadan sonuçların elde edilmesi ile oldukça avantajlı bir PZR tekniğidir [168]. Realtime PZR'nin, LightCyler sistemi ve TaqMan sistemi şeklinde ticari

olarak geliştirilmiş türleri elektroforeze gerek kalmadan sonuçların elde edilmesi ile oldukça avantajlı bir PZR tekniğidir [168]. Realtime PZR'nin, LightCyler sistemi ve TaqMan sistemi şeklinde ticari olarak geliştirilmiş türleri bulunmaktadır.

LightCyler sisteminde; sadece iki iplikli DNaya bağlandığında floresans ışıma veren boyalar (Syber green 1) kullanılır ve ortaya çıkan floresans ışımının miktarının ölçümü ile DNA miktarı ölçümü sağlanmış olur. Sentetik oligonükleotidlerin DNaya bağlanmasının ardından meydana gelen uzama aşamasında, hedef DNA'nın iki iplikli sarmal duruma gelmesiyle DNaya bağlanan Syber green 1 miktarı artış gösterir, bununla birlikte yayılan floresans ışımada artış görülür [169-171]. İki iplikli DNaya bağlanan Syber green 1 leğır ortamda bağlanılacak hedef molekül yoksa primerlerin birbirleri ile bağlanması sonucu oluşan primer dimer yapısına bağlanarak olumsuz bir şekilde floresans ışımaya neden olabilir. Bu nedenle bu sistemdeki floresans ışımadaki artış DNA amplifikasyonu ölçümünde hatalara neden olabilir. Bu durumu bertaraf edebilmek adına amplifikasyon sonucu meydana gelen ürünler için bir erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır. Her bir çift iplikli DNA'nın yarısının tek iplikli duruma gelmesi için gerekli bir sıcaklık vardır (erime sıcaklığı, T_m). PZR ile DNA miktarındaki artış ile birlikte sıcaklık değeri yükselterek ortadaki ışımada kayıtlı altına alınır. DNA'nın denatürasyonu ile Syber green 1 boyası ortamda serbest kalmakta ve floresans ışımada giderek azalmaktadır. Bu şekilde erime eğrisinden faydalanılarak amplikona ait T_m değeri ulaşılır. İncelenmek üzere elde bulunan DNA örneği ile yine bu ortamda bulunan pozitif kontrole ait örneğin T_m değeri karşılaştırılır. Bu karşılaştırma ile PZR sonucunun doğru ya da yanlışlığına karar verilir.

3' ve 5' uçlarından floresans ışımada veren moleküllerle işaretlenmiş (florokrom) olan probın kullanıldığı Taqman sisteminde, raportör florokrom olan 6- carboxyfluorescein (6-FAM) probun 5' ucunda, quencher (baskılayıcı) florokrom olan 6- carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA) ise probun 3' ucunda bulunur. Bu sistemde prob hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan bölgeye bağlanır ve bu hibridizasyonun sürdüğü zaman diliminde, raportör florokrom probun ışımada vermesi, 3' uçtaki quencher florokrom tarafından engellenir. Primerlerin hedeflenen DNA bölgesine bağlanmasının ardından başlayan primer uzaması, probun bağlanmış olduğu noktaya gelene kadar devam eder. Bu sentezin sürebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan yıkmaya başlar. Bunun neticesinde serbest kalan

raportör florokrom floresans ışına meydana getirir. Bu sayede ortamda her bir döngüde artan amplikon miktarı ile birlikte floresans ışına miktarı da artar [38, 132].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Parafin Blok Doku Arşivinde bulunan 2012 – 2014 yılları arasında PTK tanısı almış 100 adet olgunun materyali retrospektif olarak kullanılmıştır. Bu çalışma hasta hakları yönetmeliği ve etik kurallara uygun olarak planlanmış ve Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığının 13.02.2018 tarih ve 2018/02/04 numaralı kararıyla yapılmıştır.

3.2. Gereçler

1.5 mL'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 15 ml ve 50 ml falcon tüpler (Santacruz)

0.2-2 µL PZR mikropipeti (Ependorf research series), 10-100 µL'lik otomatik mikropipet (Ependorf research series), 20-200 µL'lik otomatik mikropipet (Ependorf research series) 100-1000 µL'lik otomatik mikropipet (Ependorf research series), Pipet uçları (Biopoint 2 µL, 10 µL, 100 µL , 200 µL, 500 µL, 1000 µL), Qubit ds DNA HS assay Kit 100 test (ThermoFisherScientific Q32851), Qubit assay tüpü 500 adet (ThermoFisherScientific Q32850), FFPE DNA izolasyon kiti 250 test (ThermoFisherScientific K182002), BRAF Real Time PZR Mustasyon Tespit Kiti 50 test x 2 (Entrogen BRAFM-RT64), Mikroamp Optical 96 well Plate (plaka) 10 adet /paket (Thermo 4346907 1 paket), Microamp Optical adhesive film 25 adet/paket (Thermo 4360954 1 paket), Nüve NF800R soğutmalı santrifüj cihazı, Biosan spin vortex cihazı, Minispın mini santrifüj cihazı, Nüve su banyosu, Microtom cihazı hm (Thermo scientific 355S), Xylene Shandon (Thermo 1gal.), Absolute Ethanol (Merck 100983), Ultrapure DNase RNase free Water 10977049, Polilizinli lam (Santacruz sc-363562).

3.3. Yöntem

Bu çalışmada, olgulara ait hematoksilen-eozin (H&E) boyalı patoloji arşiv preparatları yeniden değerlendirilerek kullanılmıştır. Histopatolojik olarak değerlendirilmiş olan olguların H&E boyalı preparatları üzerinde lezyonun ya da tümörün bulunduğu işaretli

alanlar belirlenerek, parafine gömülü olan dokudan DNA izolasyonu için kullanılacak alanlar belirlenmiştir. Belirlenen bu alanlar referans alınarak olgulara ait parafin bloklardan mikrotom ile 5-7 µm boyasız kesitler alınmış ve kesitler lam üzerine aktarılmıştır. Lam üzerinde bulunan kesitlerden (H&E boyalı preparatlardaki lezyonun ya da tümörün bulunduğu işaretlenmiş alan ile karşılaştırılarak) elle mikrodiseksiyon yöntemiyle doku diseksiyonu yapılmıştır. Diseksiyonu yapılan dokudan DNA izolasyonu sonrası izole edilen DNA kullanılarak realtime PZR yöntemi ile mutasyon analizi yapılmıştır.

PTK hastalığının klinik karakteriyle *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı arasındaki ilişkisinin irdelenmesi amacıyla çalışmada kullanılan olguların, cinsiyeti, tanı aldıkları yaş, PTK varyantı, tümördeki kapsül varlığı, tümör kapsül invazyonu, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon ve yumuşak doku invazyonu durumları da kayıt altına alınmıştır.

3.3.1. Dokulardan parafinin uzaklaştırılması

Parafine gömülü dokulardan her bir örnek için dokuların 5 µm kesitlerinden yaklaşık 4- 5 kesit lam üzerine alınmıştır. Üzerinde örneklere ait doku kesitlerinin yer aldığı lamlar, 35- 40 °C etüvde 20 dakika bekletilmiştir. Bekleme süreci sonrasında etüvden çıkarılan lamlar iki ayrı kaba konulan ksilol içinde, her birinde 10 dakika olmak üzere bekletilmiştir. Daha sonra ksilolün dokudan uzaklaştırılması için lamlar; sırasıyla alkol serilerinden (%96, 90, 80, 70 etil alkol) her birinde üçer dakika bekletilerek geçirilmiştir. Alkol serilerinden geçirilen lamlar distile suda 10 dakika bekletilerek alkolün dokudan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Distile sudan çıkarılan lamlar kurutulmak üzere oda sıcaklığında bırakılmıştır.

3.3.2. Lam üzerindeki dokudan tümörlü alanın alınması

Örneklere ait hematoksilin eozin boyalı preparatlarda işaretlenmiş olan tümöre ait alan, yine bu örneklere ait kesitlerin yer aldığı ve parafinden uzaklaştırılmış lamlar ile karşılaştırılarak elle mikrodiseksiyon yöntemi kullanılıp doku diseksiyonu yöntemi ile tümörlü alan mikrotüplere alınmıştır.

3.3.3. Tüplerde yer alan dokudan DNA izolasyonu

Parafinin uzaklaştırıldığı dokudan DNA izolasyonu için kullanılan kitin içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. DNA izolasyonu kiti içeriği

İçerik	250 Reaksiyon
PureLink® Genomik Lizis/Bağlanma Tamponu	50 mL
PureLink® Genomik Sindirim Tamponu	45 mL
PureLink® Genomik Yıkama Tamponu 1	50 mL
PureLink® Genomik Yıkama Tamponu 2	37.5 mL
PureLink® Genomik Elüsyon Tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)	50 mL
RNase A (20 mg/mL) 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA	5 mL
Proteinase K (20 mg/mL) depolama tamponu (tescilli)	5 mL
PureLink® Toplama tüpü döndürme kolonları	5 × 50 adet
PureLink® Toplama tüpü (2.0 mL)	5 × 100 adet

Dokulardan DNA izolasyonu için kitin önerdiği yöntem takip edilmiştir. Parafinin uzaklaştırıldığı dokuların yer aldığı her bir tüpe 20 µL proteinaz K eklenmiş ve arkasından 180 µL sindirim çözeltisi eklenerek vortekslenmiştir. Vortekslemeden sonra tüpler 55 °C’de su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler 13.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant yeni steril tüpe aktarılmıştır. Aktarılan yeni tüplerde yer alan süpernant üzerine 20 µL RNase A ilave edilerek vortex ile iyice karıştırılmış ve ardından, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüplere 200 µL liziz-bağlama çözeltisi eklenmiş ve homojen bir çözelti elde edinceye kadar vortekslenmiştir. Vorteksleme sonrasında tüplere 200 µL % 96 etanol eklenmiş ve homojen çözelti elde edinceye kadar tekrar vortekslenmiştir. Bu işlem sonrasında homojen olarak elde edilen lizat, spin kolona(döndürme kolonu) aktarılmış 10.000 g’de 1 dakika 25 °C’de santrifüj edilmiş ve sonrasında toplama tüpü boşaltılmıştır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Spin kolonlara 500 µL yıkama çözeltisi 1 ilave edilmiş ve 10.000 g’de 1 dakika 25 °C’de santrifüj edildikten sonra, toplama tüpü boşaltılmıştır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır. Spin kolona 500 µL bu kez etanolla hazırlanmış yıkama çözeltisi 2 eklenmiş, 13.000 rpm’de 3 dakika 25 °C’de santrifüj edildikten sonra toplama tüpü boşaltılmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra spin kolon 1,5 ml’lik ependorf tüpüne aktarılmış ve tüplere 100 µL elüsyon çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun ardından tüpler 13.000 rpm’de 1 dakika 25 °C’de santrifüj edilmiş ve realtime PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere saf DNA elde edilmiştir. Elde edilen bu DNAlar kısa süre için 4°C’de ya da daha uzun süreli depolama için –20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.3.4. Elde edilen DNA miktarlarının florometrik yöntem ile ölçülmesi

Örneklerden elde edilen DNA'nın realtime PZR reaksiyonlarında kullanılmak üzere yeterli miktarda olup olmadığının anlaşılabilmesi için örneklerden elde edilen DNA miktarları florometrik bir yöntem kullanılarak tespit edilmiştir.

Florometrik yöntem ile DNA miktar analizinde kullanılan kitin içeriği Çizelge 3.2.' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. DNA miktarı analizi kiti içeriği

İçerik	500 Reaksiyon
Qubit™ dsDNA HS Reaktif (Bileşen A)	1.25 mL
Qubit™ dsDNA HS Tamponu (Bileşen B)	250 mL
Qubit™ dsDNA HS Standart #1 (Bileşen C)	5 mL
Qubit™ dsDNA HS Standart #2 (Bileşen D)	5 mL

DNA miktarının belirlenmesinde kullanılan cihaz ile birlikte kullanılması gereken kitin önerdiği yöntem takip edilerek DNA ölçümleri yapılmıştır.

Ön karışım hazırlanması

Standartlar ve numuneler için gerekli sayıda 0,5 mL tüp ayarlanmış ve bu tüplerin kapakları 1. 'çalışma çözeltisi', 2. 'Standart 1' ve 3.'Standart 2' olarak etiketlenmiştir. Ölçümü yapılması planlanan her bir DNA örneği için boş tüpe 1µL reaktif ve 199 µL tampon eklenmiş ve bu şekilde çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Standart 1 ve 2'nin hazırlanması

Standart 1 olarak etiketlenmiş tüpe önce 190 µL çalışma çözeltisi konulmuş üzerine 10 µL Standart 1 çözeltisi eklenmiş ve Standart 1 son hacim 200 µL olacak şekilde elde edilmiştir. Standart 2 olarak etiketlenmiş tüpe aynı çözelti Standart 2 kullanılarak hazırlanmış ve son hacim 200 µL olacak şekilde Standart 2 elde edilmiştir.

DNA örneklerinin ölçüm için hazırlanması

Her bir DNA örneği için ayrı ayrı PZR tüpleri hazırlanmış ve örnek numaraları verilerek etiketlenmiştir. Etiketlenmiş tüplerin her birinin içine 2 µL DNA örneği alınmış ve örneklerin üzerine 198 µL çalışma çözeltisi eklenerek son hacim 200 µL olacak şekilde ayarlanıp dikkatlice 2-3 saniye vortekslenmiştir. Önce Standart 1 daha sonra Standart 2 cihaza okutularak cihazın kalibrasyonu sağlanmış ve arkasından örnekler için hazırlanmış çözeltilerin yer aldığı etiketli PZR tüpleri tek tek ölçülmek üzere cihaza koyulmuş ve elde edilen DNA miktarları çalışma grubunda yer alan her bir örnek için kaydedilmiştir.

3.3.4. Realtime PZR *BRAF V600E* mutasyon analizi

Örnek DNAlarındaki mutasyonların tespit edilmesi için altın standart olan realtime PZR yöntemi, özellikle prob tabanlı yöntem kullanıldığında, örnek içindeki 1 kopya mutant DNA kalıbını tespit edebilecek hassasiyete sahiptir. Bu çalışmada prob tabanlı üretilmiş bir kit kullanılmış ve bu sayede oldukça hassas ölçüm sonuçları elde edilmiştir. Prob tabanlı kitlerin yanı sıra ölçümde peltier teknoloji ile üretilmiş bir realtime PZR cihazı kullanılmıştır. Peltier teknolojiye sahip cihazlar kit üretici firmaların validasyonları için oldukça elverişli oluklarından daha sık tercih edilmektedirler. Bu çalışmada CE-IVD sertifikasına sahip bir kit ve bu kitin valide edildiği bir realtime PZR cihazı kullanılarak, kitin önerdiği protokol takip edilmiştir.

Realtime PZR tekniği ile *BRAF V600E* mutasyon analizinde kullanılan kitin içeriği Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Realtime PZR *BRAF V600E* mutasyon analizi kiti içeriği

İçerik	Test sayısı	Tüp sayısı
<i>BRAF</i> Reaksiyon Master Karışımı (2x)	64	2
<i>BRAF V600E</i> Tespiti Primer Karışımı	64	1
<i>BRAF V600E</i> Pozitif Kontrol Karışımı	64	1

Her örnek için, 30 μ L reaksiyon hacmi kitin önerdiği miktarda; 2X PZR reaction karışımı (15 μ L), Primer karışımı (6 μ L), DNA örneği (20-50 ng/ μ L) (1 μ L), Moleküler grade su (8 μ L) kullanılarak içerik hazırlanmıştır.

Her bir örnek için hazırlanan 30 μ L'lik reaksiyon karışımları 96 kuyucuklu PZR plakasına yerleştirilmiş ve plakaların üzeri adhesive film ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan üzeri filmli PZR plakaları santrifüj cihazının plaka rotoru kullanılarak santrifüj edilmiş ve tüm reaksiyon karışımının PZR plaka kuyusunun altına inmesi sağlanmıştır. Tüm bu işlemlerin ardından plaka realtime PZR cihazına yerleştirilmiş ve kitin önerdiği sıcaklık döngüleri cihaza programlanarak cihaz çalıştırılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Realtime PZR sıcaklık döngüleri

Sıcaklık	Zaman	Döngü	Veri Toplama
95°C	10 Dakika	1 döngü	Kapalı
95°C	20 saniye	40 döngü	Kapalı
64°C	45 saniye	40 döngü	Açık

Sonuç analiz kriterleri

Çalışmanın bitiminden sonra analiz için cihazda sırasıyla aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

1. Pozitif kontrol kuyuları seçilerek VIC/yellow reporter kanalı seçilir.
2. Bütün kuyuların amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel gelişim fazının tam orta noktasına threshold ayarlanır.
3. Bütün kuyulardaki VIC sinyalleri kontrol edilerek kuyulara yüklemelerin doğru yapıldığından emin olunur. Negatif kuyular hariç bütün kuyularda VIC sinyali (internal pozitif kontrol) sinyali alındığı görülür.
4. Yukarıdaki izlenen yolu takiben pozitif kontrol ve örneklerin yükleme sonuçları Çizelge 3.5.'de verilen ölçütlere göre değerlendirilir.

Çizelge 3.5. Realtime PZR sonuçları değerlendirme ölçütleri

Ct (VIC Kanalı)	Analiz Tanımı	Aksiyon
Ct değeri 20 ile 30 arasında	İdeal Ct	1.Aşamaya geçilir.
Ct değeri 20' den düşük	Aşırı örnek DNA'sı	Örnek seyreltilerek reaksiyon tekrar edilir.
Ct değeri 30'dan büyük	Yeterli DNA mevcut değil	Örnek miktarı artırılarak reaksiyon tekrarı ya da DNA izolasyonu tekrarı yapılır.

5. Pozitif kontrol kuyuları seçilerek bu kez FAM kanalı seçilir.
6. Bütün kuyuların amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel gelişim fazının tam orta noktasına threshold ayarlanır.
7. Bütün kuyulardaki sinyaller kontrol edilir.
 - a. Yüksek mutasyona sahip örneklerin Ct değerleri düşük çıkmaktayken, düşük mutasyona sahip örneklerin Ct değerleri yüksek çıkmaktadır.
 - b. Bütün kuyulardaki Ct eğrileri amplifikasyon eğri kontrolü ile gözle görülmelidir.
8. Sonuçlar Ct tablosu halinde rapor olarak cihazdan alınır ve çizelge 3.6.'da verilen kriterlere göre analiz edilir.

Çizelge 3.6. Ct değerleri değerlendirme kriterleri

Ct (FAM Kanalı)	Mutasyon Statüsü
Ct 37 ya da daha düşük	Pozitif (Mutasyon Var)
Ct 37'den büyük	5-10 kat fazla DNA ile test tekrar edilir. Eğer Ct 1 döngü düşerse örnek pozitif olarak değerlendirilir. Eğer Ct değişmezse örnek negatif olarak değerlendirilir.
Ct görünmüyor	Negatif (Mutasyon Yok)

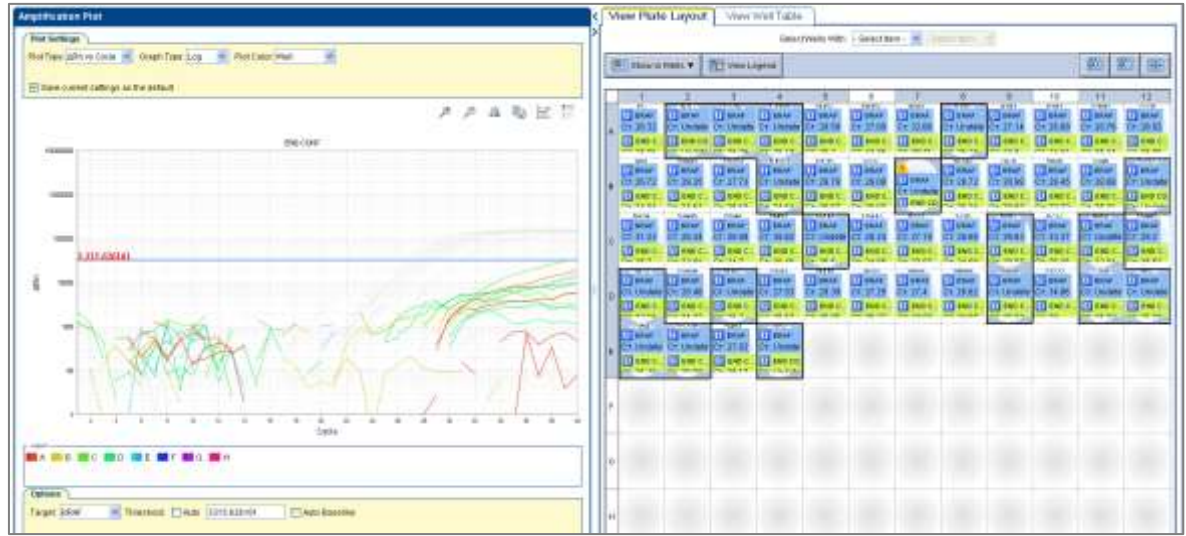


4. SONUÇ

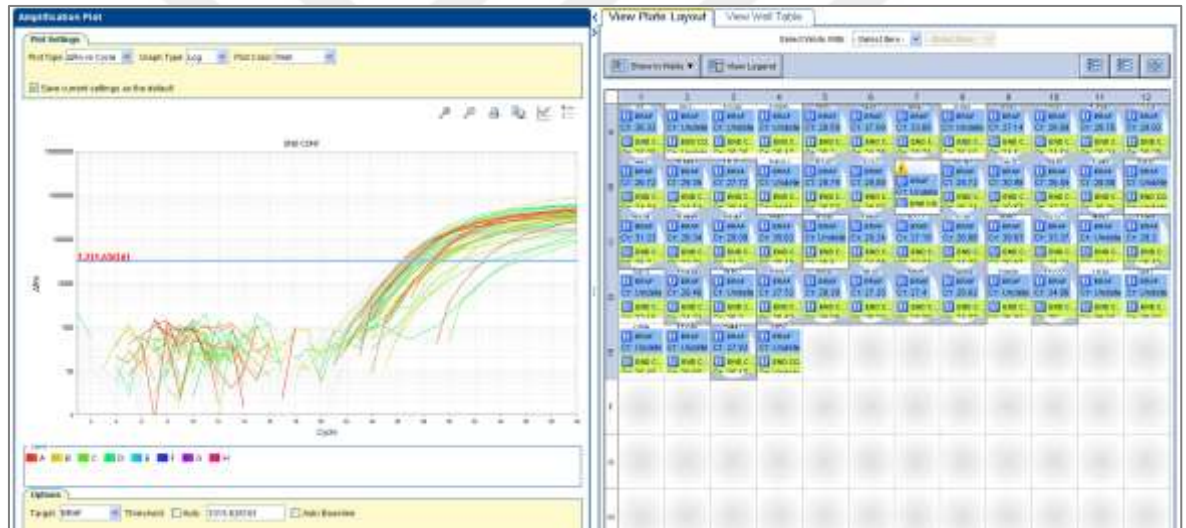
Bu bölümde 100 adet olguya ait FFPE dokulardan elde edilen DNA ile yapılan çalışma sonrası elde edilen bulgulara yer verilmiştir. Öncelikle realtime PZR reaksiyonları ile elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılan kitin, çalışmada kullanılan cihaz için önerdiği yöntem doğrultusunda analiz edilmiş ardından bu analizin sonucunda elde edilen veriler istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

4.1. Realtime PZR Analizi Verileri

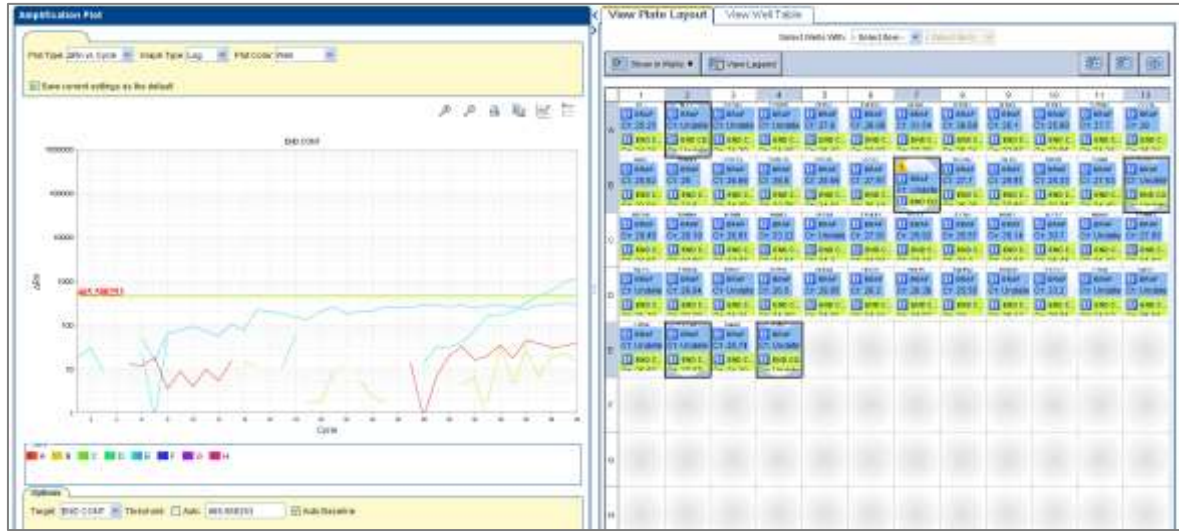
Realtime PZR ile *BRAF V600E* mutasyonu analizinde kullanılan kitin her bir testi yabancı tipte (yaygın alel) meydana gelmiş %1'lik mutasyonu dahi saptayabilmektedir. Ancak bu kitin reaksiyonlarda %1'lik mutasyonu saptayabilmesi için örnek başına en az 20 ng DNAya ihtiyaç vardır. Çalışma yapılacak olan 100 örneğin 5 tanesinin FFPE dokularından, realtime PZR reaksiyonları için kitin önerdiği miktarda yeterli DNA elde edilemediğinden bu 5 örnek çalışmaya dahil edilememiştir. Bunun dışında kalan 95 örneğe ait DNAlar ile realtime PZR çalışması yapılmıştır. Bu 95 örneğin yedi tanesinin FFPE dokularından kitin önerdiği alt sınırın oldukça altında DNA elde edilmiştir. Bu yedi olgu ile PZR reaksiyonu karışımı hazırlanırken yaklaşık 20 ng değerine yakın olacak şekilde reaksiyon karışımındaki DNA hacmi artırılarak çalışma yapılmıştır. Realtime PZR reaksiyonların gerçekleşmesinin ardından analiz basamağına geçilmiş ve kitin cihaz için önerdiği protokol takip edilerek analiz yapılmıştır. Yapılan analiz aşamasında Ct değeri 37 ve altı olan örnekler incelenen mutasyonu açısından pozitif, Ct görünmüyor ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Ct değeri 37'den büyük olan örneklerde ise test tekrarına gidilmiş ve en nihayetinde 95 örneğin 88'inde mutasyonun pozitif ya da negatifliği ile ilgili sonuç elde edilmiş 7 örnekten ise test tekrarlanmasına rağmen mutasyonun pozitif ya da negatifliği ile ilgili herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Realtime PZR reaksiyonları için örneklerden elde edilen DNAlar ile üç ayrı plakada çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda örneklerden elde edilen Ct değerlerinin görüntüsü cihazın bağlı olduğu bilgisayar ekranından alınmıştır. Resim 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4. 1. Plakaya ait analiz sonucu görüntülerini içermektedir.



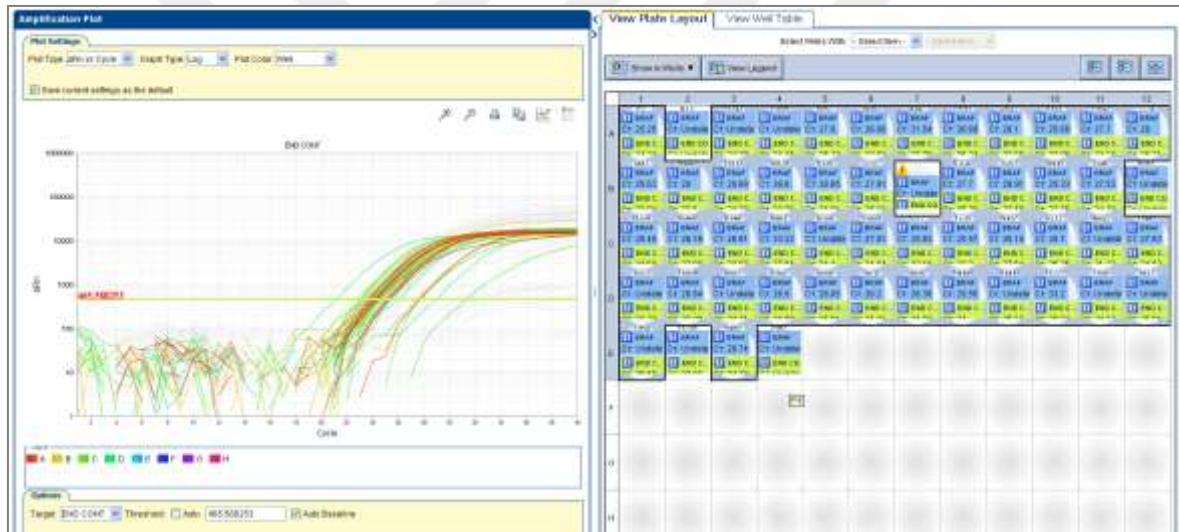
Resim 4.1. 1. plaka *BRAF* V600E negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü



Resim 4.2. 1. plaka *BRAF* V600E pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü

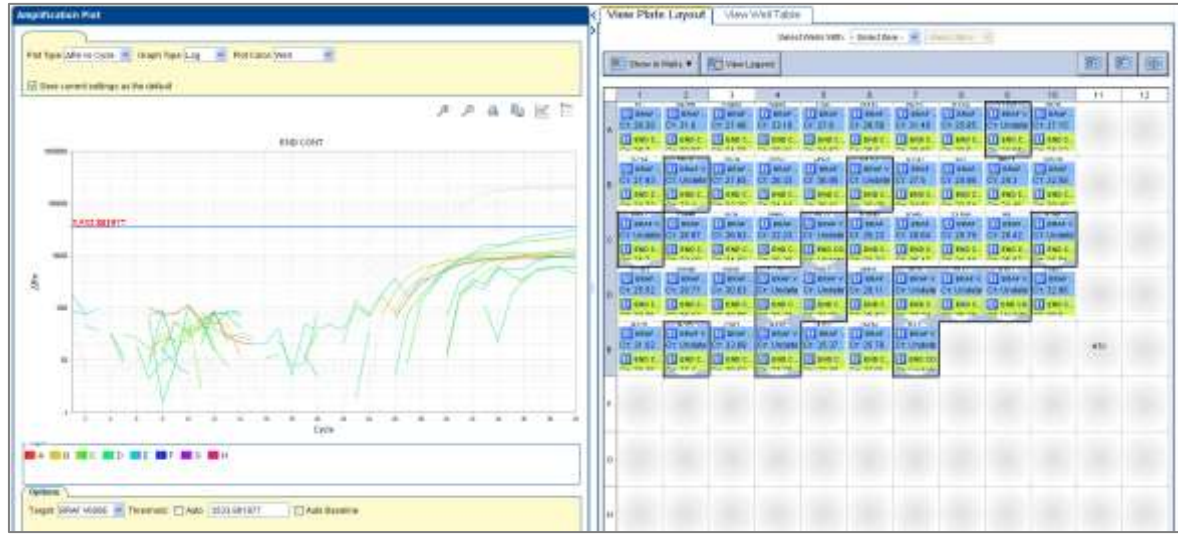


Resim 4.3. 1. plaka endojen kontrol negatifler realtime PZR analizi görüntüsü

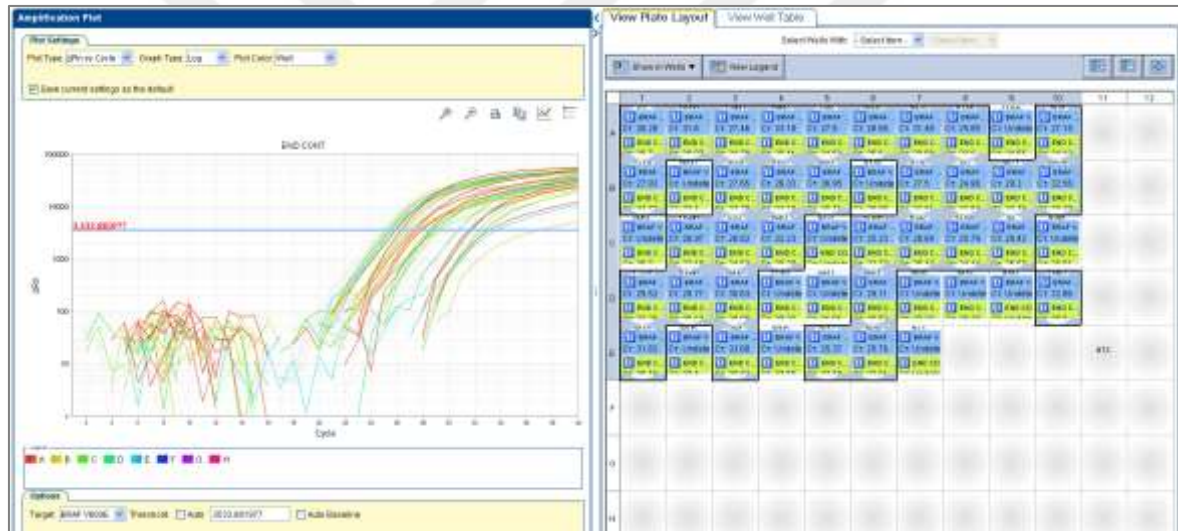


Resim 4.4. 1. plaka endojen kontrol pozitifler realtime PZR analizi görüntüsü

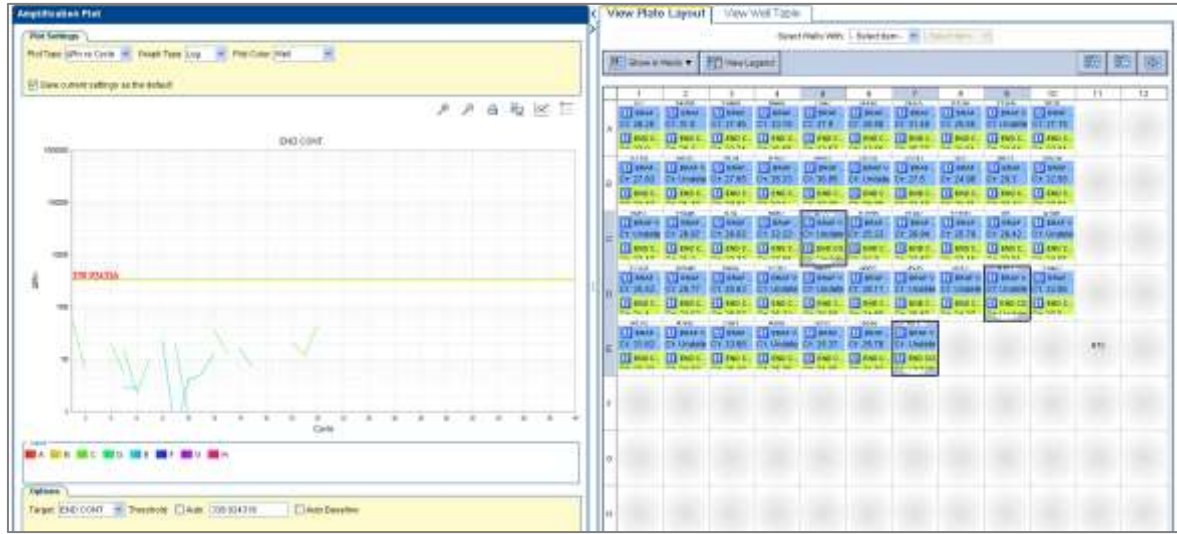
Resim 4.5., 4.6., 4.7. ve 4.8. 2. Plakaya ait analiz sonucu görüntülerini içermektedir.



Resim 4.5. 2. plaka *BRAF* V600E negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü



Resim 4.6. 2. plaka *BRAF* V600E pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü

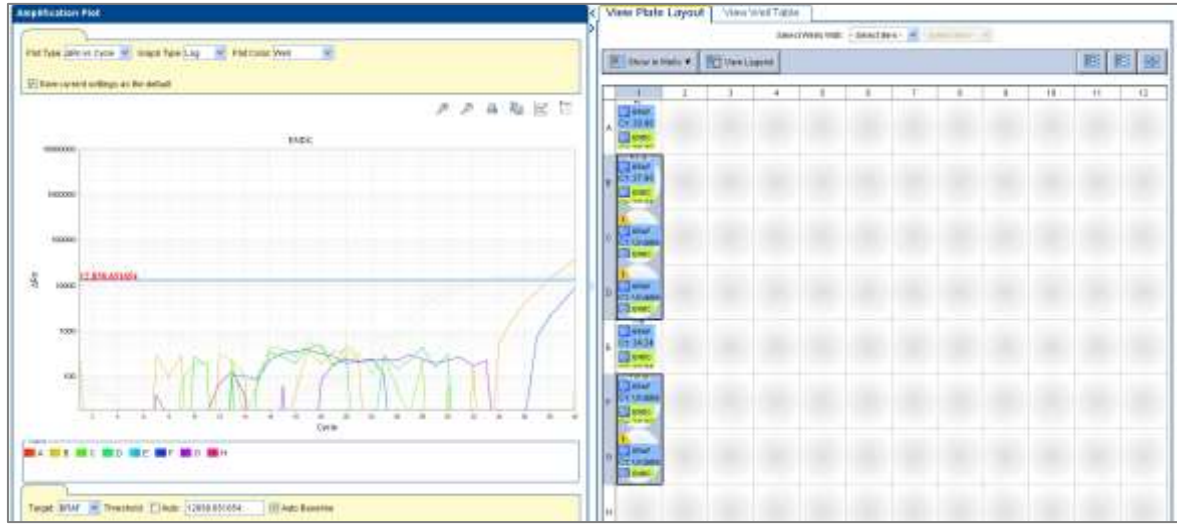


Resim 4.7. 2.plaka endojen negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü

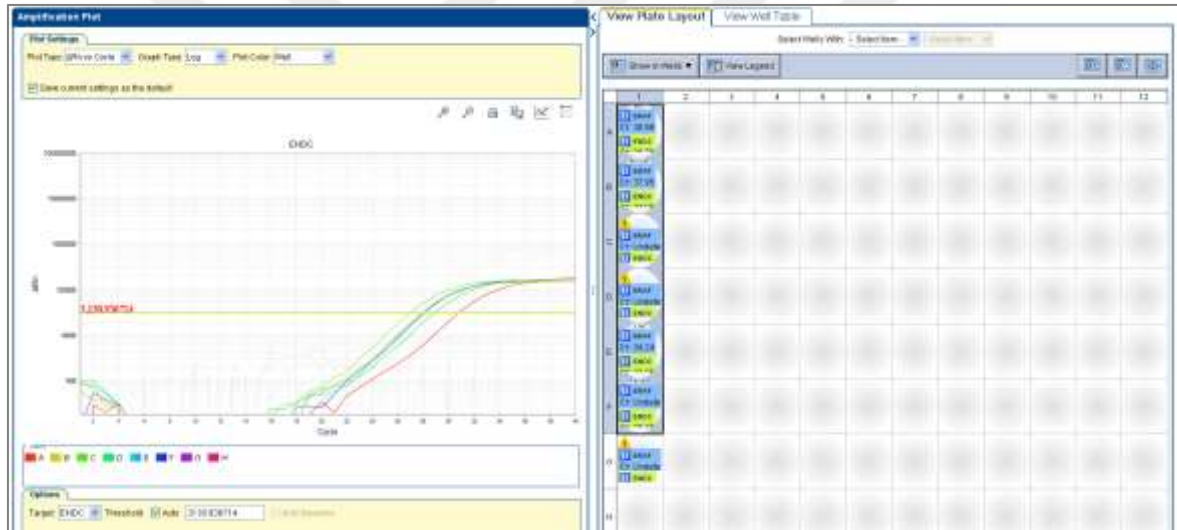


Resim 4.8. 2. plaka endojen pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü

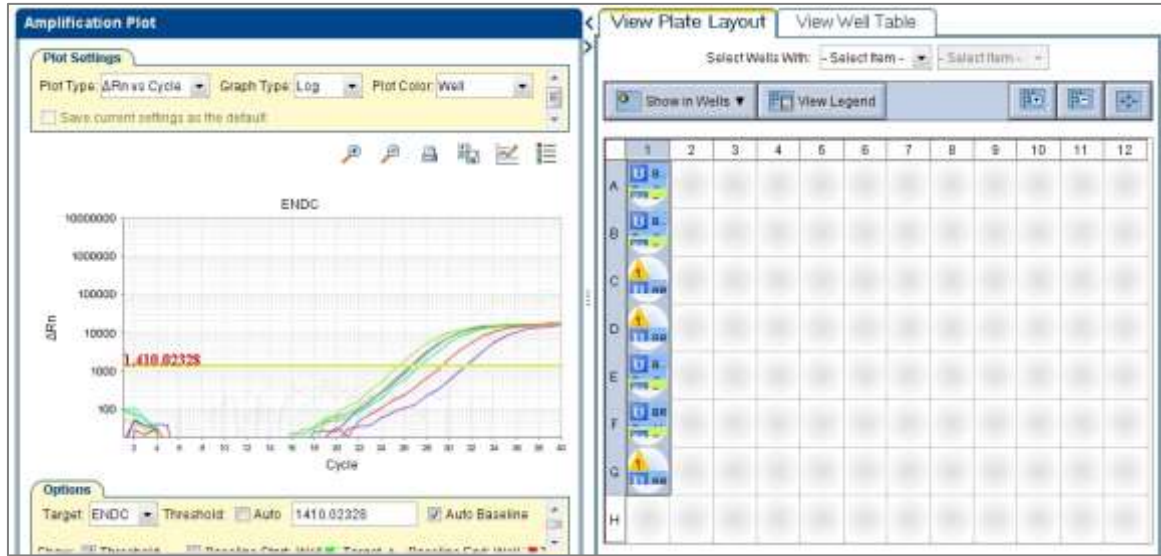
Resim 4.9., 4.10., ve 4.11. 3. plakaya ait analiz sonucu görüntülerini içermektedir.



Resim 4.9. 3. plaka *BRAF V600E* negatif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü



Resim 4.10. 3. plaka *BRAF V600E* pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü



Resim 4.11. 3. plaka endojen kontrol pozitif örnekler realtime PZR analizi görüntüsü

4.2. İstatistiksel Analiz Sonucu

Bu bölümde olgular ile yapılan çalışma sonrası elde edilen bulgulara ve istatistiksel analizlere yer verilmiştir. Araştırmada istatistiksel analizler için SPSS 25.0 paket programı kullanılmıştır. Araştırmada değişkenler açısından frekans ve yüzdelere hesaplanmış, değişkenler arasındaki ilişkiler için pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Yapılan analizlerde anlamlılık %95 güven aralığında alınmış olup bu düzey $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bu araştırmada demografik, patolojik ve klinik bazı özellikleri belirlenmiş olan 95 olguya ait veriler kullanılmıştır. Bu olguların yedisinde *BRAF V600E* mutasyonunun incelenmesinde realtime PZR reaksiyonu sonucu pozitif ya da negatif şeklinde bir değerlendirilmeye ulaşılamadığı için bu 7 olgu istatistiksel olarak çalışma dışı bırakılmış ve araştırmaya katılan 88 olguya ait bulgulara bu bölümde verilmiştir.

4.2.1. Demografik, patolojik ve klinik veriler

Çizelge 4.1.'de olguların cinsiyetine ait verilere yer verilmiştir. PTK tanısı almış olgularda cinsiyetlerin oransal dağılımı 88 olguda 52 (%59,1) kadın ve 36 (%40,9) erkek şeklindedir. Çalışma yapılan bu olgu grubunda PTK tanısı almış kadınların az farkla da olsa erkeklerden daha fazla oranda olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. Olguların cinsiyete göre dağılımı

Değişken	n	%
Kadın	52	59,1
Erkek	36	40,9
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.2’de olguların yaş kategorilerine ait verilere yer verilmiştir. PTK tanısı almış olan bu çalışmadaki olguların 5’i (%5,7) 24 yaş altında, 36’sı (%40,9) 25-44 yaş aralığında, 33’ü (%37,5) 45-64 yaş aralığında ve 14’ü (%15,9) ise 65 yaş ve üzerindedir. Çalışma grubundaki 25-44 yaş ve 45-65 yaş aralıklarının birbirine yakın sıklıkta ve diğer yaşlara kıyasla daha fazla sıklıkta olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2. Olguların yaş kategorisine göre dağılımı

Değişken	n	%
24 yaş ve altı	5	5,7
25-44 yaş	36	40,9
45-64 yaş	33	37,5
65 yaş ve üzeri	14	15,9
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.3.’de olguların PTK varyantına ait verilere yer verilmiştir. PTK tanısı almış 88 olgudan 52’sinin (%59,1) PTK varyantı klasik, 26’sının (%29,5) PTK varyantı folliküler, 10’unun (%11,4) PTK varyantı ise Tall cell olarak görülmüştür. Bu çalışma grubu açısından değerlendirildiğinde klasik varyant PTK’nin folliküler ve tall cell varyant PTK’ye göre daha sık olarak görüldüğü değerlendirilmiştir. Tüm bu varyantların içerisinde en seyrek olarak görülen ise tall cell varyant PTK olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. PTK varyantı

Değişken	n	%
Klasik	52	59,1
Foliküler	26	29,5
Tall cell	10	11,4
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.4.'de olguların tümör dokularındaki kapsül varlığına ait verilere yer verilmiştir. Olguların 49'unda (% 55,7) tümörde kapsül bulunmakta, 39'unda (%44,3) ise bulunmamaktadır. Çalışma grubundaki olgulardaki tümörde kapsül bulunanlar ile tümörde kapsül olmayanların sıklığı arasındaki farkın çok yüksek olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.4. Tümör kapsül varlığı

Değişken	n	%
Var	49	55,7
Yok	39	44,3
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.5.'de olguların tümör kapsül invazyonuna ait verilere yer verilmiştir. 88 olgunun 31'inde (% 35,2) tümör kapsül invazyonu bulunmakta, 57'sinde (%64,8) ise bulunmamaktadır. Bu çalışma grubundaki olgularda tümör kapsül invazyonu olmayanların daha sık olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5. Tümör kapsül invazyonu

Değişken	n	%
Var	31	35,2
Yok	57	64,8
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.6.'da olgulardaki lenf nodu metastazına ait verilere yer verilmiştir. Olguların 36'sında (% 40,9) lenf nodu metastazı bulunmakta, 52'sinde (%59,1) ise bulunmamaktadır. Bu çalışma grubundaki olgularda lenf nodu metastazı olmayanların daha sık olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.6. Lenf nodu metastazı

Değişken	n	%
Var	36	40,9
Yok	52	59,1
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.7.'de olgulardaki vasküler invazyona ait verilere yer verilmiştir. 88 olgunun 27'sinde (% 30,7) vasküler invazyon bulunmakta, 61'inde (%30,7) ise bulunmamaktadır.

Çizelge 4.7. Vasküler invazyon

Değişken	n	%
Var	27	30,7
Yok	61	69,3
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.8.'de olgulardaki yumuşak doku invazyonuna ait verilere yer verilmiştir. Olguların 44'ünde (% 50,0) vasküler invazyon bulunmakta, 44'ünde (% 50,0) ise bulunmamaktadır. Bu çalışma grubundaki olgularda, yumuşak doku invazyonu bulunması ile bulunmaması sıklığının birbirine eşit olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8. Yumuşak doku invazyonu

Değişken	n	%
Var	44	50,0
Yok	44	50,0
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.9.'da olgulardaki tiroid kapsül invazyonuna ait verilere yer verilmiştir. Olguların 34'ünde (% 38,6) tiroid kapsül invazyonu bulunmakta 54'ünde (% 61,4) ise bulunmamaktadır.

Çizelge 4.9. Tiroid kapsül invazyonu

Değişken	n	%
Var	34	38,6
Yok	54	61,4
Toplam	88	100,0

Çizelge 4.10'da olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonu tespit edilmesine dair istatistiksel verilere yer verilmiştir. 88 olgunun 30'unda (% 34,1) *BRAF V600E* mutasyonu negatif olarak, 58'inde (% 65,9) ise pozitif olarak tespit edilmiştir. Tüm olgular arasında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olanların negatif olanlara kıyasla daha sık olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.10. *BRAF V600E* mutasyonu analizi verileri

Değişken	n	%
Negatif	30	34,1
Pozitif	58	65,9
Toplam	88	100,0

Bu çalışmada tüm olgulardan elde edilen demografik, patolojik ve klinik veriler (cinsiyet, yaş, tümör kapsül varlığı, tümör kapsül invazyonu, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, yumuşak doku invazyonu, tiroid kapsül invazyonu) Çizelge 4.11’de birarada gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Demografik, patolojik ve klinik veriler

Değişken	n (tüm olgular içindeki sayısı)	% (tüm olgular içindeki yüzdesi)
Kadın	52	59,1
Erkek	36	40,9
24 yaş ve altı	5	5,7
25-44 yaş	36	40,9
45-64 yaş	33	37,5
65 yaş ve üzeri	14	15,9
Klasik varyant	52	59,1
Foliküler varyant	26	29,5
Tall cell varyant	10	11,4
Tümörde kapsül var	49	55,7
Tümörde kapsül yok	39	44,3
Tümör kapsül invazyonu var	31	35,2
Tümör kapsül invazyonu	57	64,8
Lenf nodu metastazı var	36	40,9
Lenf nodu metastazı yok	52	59,1
Vasküler invazyon var	27	30,7
Vasküler invazyon yok	61	69,3
Yumuşak doku invazyonu var	44	50,0
Yumuşak doku invazyonu yok	44	50,0
Tiroid kapsül invazyonu var	34	38,6
Tiroid kapsül invazyonu yok	54	61,4
<i>BRAF V600E</i> mutasyonu negatif	30	34,1
<i>BRAF V600E</i> mutasyonu pozitif	58	65,9
Toplam	88	100,0

4.2.2. Demografik, patolojik ve klinik verilere ait istatistiksel değerlendirmeler

Çalışmada verisi kullanılan, PTK tanısı almış 88 olguya ait tümör dokularındaki hücrelerden izole edilen DNA kullanılarak yapılan *BRAF V600E* mutasyon analizi sonucunda elde edilen veriler ile ilgili mutasyonuna göre cinsiyet açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Bu mutasyonun varlığı ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı gibi ikisi arasında bir ilişkiye de rastlanmamıştır. Çalışmaya alınan kadınların % 40,4'ünde *BRAF V600E* mutasyonu negatif, %59,6'sında ise pozitifdir. Çalışmaya alınan erkeklerin %25'inde bu mutasyonu negatif, %75'inde ise pozitifdir. Her iki cinsiyette de mutasyonun pozitifliğinin, mutasyonun negatifliğine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Cinsiyet * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> Mutasyonu		Toplam	X ²	P
			Negatif	Pozitif			
Cinsiyet	Kadın	n	21	31	52		
		%	40,4%	59,6%	100,0%		
	Erkek	n	9	27	36		
		%	25,0%	75,0%	100,0%	2.241	0,134
Toplam		n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

İlişki yok.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre yaş değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. *BRAF V600E* mutasyonuna göre yaş değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunmuştur ($p<0,050$). Bu farklılığın 45-64 ve 65 yaş üstünden kaynaklandığı düşünülmektedir. 45-64 yaş aralığında çalışmaya alınan bireylerin yaklaşık %79'da *BRAF V600E* mutasyonu pozitifdir. Yine 65 yaş üstü bireylerin %80'inde mutasyon pozitifdir. Yapılan bu analizlemede, olgular arasında 44 yaşından itibaren ileriki yaş ile birlikte *BRAF V600E* mutasyonundaki pozitifliğin arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13)

Çizelge 4.13. Yaş kategori * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> <i>Mutasyonu</i>		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Yaş kategori	24 yaş ve altı	n	1	4	5	9,472	0,024*
		%	20,0%	80,0%	100,0%		
	25-44 yaş	n	19	17	36		
		%	52,8%	47,2%	100,0%		
	45-64 yaş	n	7	26	33		
		%	21,2%	78,8%	100,0%		
	65 yaş ve üzeri	n	3	11	14		
		%	21,4%	78,6%	100,0%		
	Toplam	n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

Elde edilen verilerden hareketle PTK tanısı alan olgulardan ileri yaş olanlarda, *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliğinin sorgulanmasının hastalığın tedavisinin planlanmasında ve takibinin yapılmasında fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre PTK varyantı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. PTK varyantı değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunmuştur (p<0,050). Bu çalışma grubu için PTK varyantı açısından tall cell ve klasik varyant tanısı almış olan olgularda *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliği daha sık görülmekte iken folliküler varyantta ise negatifliğin daha sık görülmesine rağmen pozitifliğin de görülebileceği bulgusuna ulaşılmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. PTK varyantı * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> <i>Mutasyonu</i>		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
PTK varyantı	Klasik	n	5	47	52	48,955	0,001*
		%	9,6%	90,4%	100,0%		
	Folliküler	n	23	3	26		
		%	88,5%	11,5%	100,0%		
	Tall cell	n	2	8	10		
		%	20,0%	80,0%	100,0%		
	Toplam	n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

Elde edilen bu verilerden ve her üç varyantta da mutasyon negatif olguların da bulunmasından hareketle klasik varyant PTK ile tall cell varyant PTK’de *BRAF V600E* mutasyonunun varlığının sorgulanması tedavi ve hastalığın takibine fayda sağlayabilir. Bunun yanında olgunun folliküler varyant PTK tanısı almış olmasının *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı /yokluğu hakkında kesin bir yargıya ulaşabilmede yol gösterici olarak kullanılabilmesinin çok da mümkün olmadığı düşünülmektedir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre tümör kapsül varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Yapılan analiz sonucunda tümör kapsül varlığı değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunmuştur ($p<0,050$). *BRAF V600E* mutasyonu negatif olarak tespit edilen olguların %49,0’unda tümörde kapsül varken, %15,4’ünde kapsül bulunmamaktadır. *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilen olguların ise % 51’inde tümör kapsüle sahipken , %84,6’sında tümör kapsülü bulunmamaktadır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Tümör kapsül varlığı * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> <i>Mutasyonu</i>		Toplam	X ²	p	
			Negatif	Pozitif				
Tümör kapsül varlığı	Var	n	24	25	49	10,908	0,001*	
		%	49,0%	51,0%	100,0%			
	Yok	n	6	33	39			
		%	15,4%	84,6%	100,0%			
Toplam	n		30	58	88			
	%		34,1%	65,9%	100,0%			

*= $p<0,050$ Anlamlı ilişki var

Ortaya çıkan bu sonuçtan hareketle tümör kapsülü olmayan olgularda *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliğinin daha sık görüldüğü, tümörde kapsül varlığı ile mutasyonun pozitifliği arasında ters ilişkinin olabileceği düşünülmektedir. PTK’nin tanı ve tedavi ve takibine yaklaşımda bu ilişkinin göz önünde bulundurularak planlamanın yapılması fayda sağlayabilir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre tümör kapsül invazyonu varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Tümör kapsül

invazyonu değişkeni açısından bu mutasyonunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunamamıştır. Hem tümör kapsül invazyonu varlığında hem de tümör kapsül invazyonu yokluğunda bu mutasyonun pozitifliğin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Tümör kapsül invazyonu * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> Mutasyonu		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Tümör kapsül invazyonu	Var	n	11	20	31	0,041	0,839
		%	35,5%	64,5%	100,0%		
	Yok	n	19	38	57		
		%	33,3%	66,7%	100,0%		
Toplam		n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

İlişki yok.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre lenf nodu metastazı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Yapılan bu analizde, lenf nodu metastazı değişkeni açısından bu mutasyonu pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ve lenf nodu metastazına sahip olguların *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğine de sahipken lenf nodu metastazı olmayan olguların *BRAF V600E* mutasyonu açısından negatif olarak değerlendirildiği görülmüştür (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Lenf nodu metastazı * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> Mutasyonu		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Lenf nodu metastazı	Var	n	0	36	36	31,512	0,001*
		%	0,0%	100,0%	100,0%		
	Yok	n	30	22	52		
		%	57,7%	42,3%	100,0%		
Toplam		n	30	30	58		
		%	34,1%	34,1%	65,9%		

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

Elde edilen bu verilerden hareketle lenf nodu metastazının varlığı ile *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliği arasında ilişki olduğu ve bu ilişkiden hareketle lenf nodu metastazına sahip olan PTK'li olgularda bu mutasyonunun varlığının akla getirilmesinin hastalığı tedavi etmede kullanılacak yöntemin belirlenmesinde ve hastalığın takibine katkı sunacağı düşünülmektedir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre vasküler invazyon varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Vasküler invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunamamıştır. Hem vasküler invazyona sahip olan hem de vasküler invazyonu olmayan olgularda *BRAF V600E* açısından pozitiflik ve negatiflik görülebileceği ve tüm olgularda mutasyon pozitifliğinin, mutasyon negatifliğe göre daha yüksek olarak ortaya çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Vasküler invazyon * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> <i>Mutasyonu</i>		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Vasküler invazyon	Var	n	6	21	27	2,442	0,118
		%	22,2%	77,8%	100,0%		
	Yok	n	24	37	61		
		%	39,3%	60,7%	100,0%		
Toplam		n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

İlişki yok.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre yumuşak doku invazyon varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Yapılan bu analizde, yumuşak doku invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ve yumuşak doku invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edildiği görülmüştür. Yumuşak doku invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliği, olguların % 79,5'inde görülürken, yumuşak doku invazyonu yokluğunda olguların %52,3'ünde görülmüştür (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Yumuşak doku invazyonu * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> Mutasyonu		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Yumuşak doku invazyonu	Var	n	9	35	44	7,283	0,007 *
		%	20,5%	79,5%	100,0%		
	Yok	n	21	23	44		
		%	47,7%	52,3%	100,0%		
Toplam		n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

Elde edilen bu verilerden hareketle, PTK'de *BRAF V600E* mutasyonu tespit edilmesi halinde yumuşak doku invazyonunun görülme ihtimalinin artabileceği, dolayısıyla hastalığın tedavi, takip ve prognozunun seyrine bu bağlamda yaklaşılmasının doğru olabileceği düşünülmektedir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre tiroid kapsül invazyonu varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına ki kare analizi ile bakılmıştır. Yapılan bu analizde, tiroid kapsül invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ve tiroid kapsül invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edildiği görülmüştür. Tiroid kapsül invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliği olguların %88,2'sinde görülürken, tiroid kapsül invazyonu bulunmadı durumlarda ise *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliği olguların %51,9'unda görülmüştür (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Tiroid kapsül invazyonu * *BRAF V600E* mutasyonu

			<i>BRAF V600E</i> Mutasyonu		Toplam	X ²	p
			Negatif	Pozitif			
Tiroid kapsül invazyonu	Var	n	4	30	34	12,292	0,001*
		%	11,8%	88,2%	100,0%		
	Yok	n	26	28	54		
		%	48,1%	51,9%	100,0%		
Toplam		n	30	58	88		
		%	34,1%	65,9%	100,0%		

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

Bu çalışmada demografik, patolojik ve klinik olarak elde edilen verilerle *BRAF V600E* mutasyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak analiz edilmesi sonucu elde edilen tüm bulgular Çizelge 4.21. 'de birleştirilmiş olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Demografik, patolojik ve klinik verilerle *BRAF V600E* mutasyonu ilişkisi

	Negatif Olgu Sayısı	Pozitif Olgu Sayısı	Toplam Olgu Sayısı	X ²	P
Kadın	21	31	52	2,241	0,134
Erkek	9	27	36		
24 yaş ve altı	1	4	5		
25-44 yaş	19	17	36	9,472	0,024*
45-64 yaş	7	26	33		
65 yaş ve üzeri	3	11	14		
Klasik varyant	5	47	52		
Foliküler varyant	23	3	26	48,955	0,001*
Tall cell varyant	2	8	10		
Tümörde kapsül var	24	25	49		
Tümörde kapsül yok	6	33	39	10,908	0,001*
Tümör kapsül invazyonu var	11	20	31		
Tümör kapsül invazyonu yok	19	38	57	0,041	0,839
Lenf nodu metastazı var	0	36	36		
Lenf nodu metastazı yok	30	22	52	31,512	0,001*
Vasküler invazyon var	6	21	27		
Vasküler invazyon yok	24	37	61	2,442	0,118
Yumuşak doku invazyonu var	9	35	44		
Yumuşak doku invazyonu yok	21	23	44	7,283	0,007*
Tiroid kapsül invazyonu var	4	30	34		
Tiroid kapsül invazyonu yok	26	28	54	12,292	0,001*

*=p<0,050 Anlamlı ilişki var

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Endokrin sistemde görülen kanserler içinde en sık ortaya çıkan endokrin kanser türü, tiroid dokusunda ortaya çıkan kanserlerdir. Yapılan bir çalışmada tiroid dokusunda meydana gelen kanserlerin, tüm endokrin malignitelerin yaklaşık olarak %94'ünden sorumlu olduğu bildirilmiştir [1]. Aynı şekilde tiroid dokusunda görülen kanserler, endokrin sistemde ortaya çıkan kanserlere bağlı ölümlerin ise yaklaşık %66'sını oluşturmaktadır [56]. PTK, tiroid dokusunda meydana gelen kanser türleri arasında en sık olarak ortaya çıkan tiroid kanseri türüdür. Tanı alan yeni tiroid kanseri vakalarının yaklaşık %70-75 kadarı papiller tiroid karsinomudur [3]. Papiller tiroid kanseri yılda 100000'de 2-4 yeni vaka ile kendini gösteren ve endokrin tümörler içerisinde en yaygın olarak ortaya çıkan tümör türüdür [144].

Çoğunlukla kinaz domeinin glisince zengin olan ilmiği ve aktive edici segmentinde ortaya çıkan aktive edici *BRAF* geni mutasyonları, bu genin ekzon 15'inin 1799'uncu pozisyonunda meydana gelen transversiyon (T/A) sonucu ortaya çıkar. Mutasyonun görülmesi ile valin amino asidi yerine glutamat amino asidi transkripsiyonu gerçekleşir ve ortaya çıkan bu değişim sonucunda *BRAF* geninin kinaz aktivitesi sürekli açık hale gelir. Amino asit değişikliği ile translasyonu gerçekleşen protein yüksek kinaz aktivitesi yeteneği ile NIH3T3 hücrelerini transforme eder. *BRAF* geninde meydana gelen mutasyonlar %70 sıklıkla malin melanomlarda ardından %10-20 sıklıkla kolon, yumurtalık, akciğer dokusunda görülen kanserlerde ve yumuşak doku kanserlerinde görülmektedir [145,77].

Son yıllarda tiroid dokusunda görülen kanserlerin ortaya çıkmasına neden olan moleküler yollarla ilgili olarak pek çok çalışma yapılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarla birlikte, tiroid kanserinin tedavi ve takibinde farklı yaklaşımlar ortaya atılmıştır. Moleküler yollardaki genlerde meydana gelen yeniden düzenlemeler tiroid kanseri tümörlerine tanı koyma, hastalığın tedavisi, prognozu ve takibinde belirleyici role sahiptir. Bu bağlamda moleküler yollarda görülen genetik mutasyonların anlaşılması tiroid kanserleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunmasına ve hastalığın tanı, tedavi, takip ve prognozuna yaklaşımda, klinisyenler ve cerrahlar için yol gösterici ve yönlendirici olmaktadır.

Yapılan bu çalışmada papiller tiroid karsinomlu olgularda *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı realtime PZR tekniği ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda mutasyonun varlığının/yokluğunun, olgu grubunun kayıt altına alınmış olan cinsiyet, yaş, PTK varyantı,

tümörde kapsül varlığı, tümör kapsül invazyonu, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon, yumuşak doku invazyonu ve tiroid kapsül invazyonu gibi demografik ve klinik bazı verileri ile istatistiksel açıdan anlamlı fark/ilişki olup olmadığına bakılmıştır.

PTK'de *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı ile ilgili olarak bugüne kadar yapılmış olan çalışmaların sonuçları literatürde farklılık göstermektedir. Sonuçlarda görülen bu farklılıklar, çalışma yapılan olgu grubunun etnisitesine, PTK histolojik alt tiplerinin değişen oranlarda çalışılmış olmasına, olguların bulunduğu coğrafyaya, farklı cinsiyet ve yaş gruplarının bulunmasına, çalışmaların aspirasyon biyopsisi sitoloji örnekleri ya da retrospektif olarak FFPE doku örnekleri gibi farklı materyaller ile yapılmış olmasına, mutasyonun tespitinde kullanılan tekniğin farklı olmasına ve farklı laboratuvar koşullarına bağlı olarak ile ortaya çıkmış olabilir.

Transgenik fareler ile yapılan bir çalışmada tiroit hücrelerinde *BRAF V600E* mutasyonu bulunması durumunda hücrelerin tümörleşme yönünde farklılaşmasının daha agresif olduğu gösterilmiştir [97].

2003 yılında PTK tanısı almış 35 olgu ile yapılan bir çalışmada olguların 24'ünde (%69) *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir [148].

76 PTK tanısı almış olgu ile yapılan bir çalışmada, olguların %53'ünde *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak bularak, bu mutasyonun PTK karsinogenezinde oldukça önemli bir işleve sahip olduğu ve PTK'yi diğer tiroid kanseri çeşitlerinden ayırmada bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür[149].

PTK tanısı almış 547 olgu ile yapılmış bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonu, olguların %69,7'sinde pozitif olarak tespit edilmiş ayrıca mutasyonun varlığı ile erkek cinsiyet,45 üstü yaş, ekstratiroidel yayılım ve lenf nodu metastazı arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmuştur [43].

İtalya'da 2007 yılında PTK tanısı almış 500 olgu ile yapılan bir çalışmada, *BRAF V600E* mutasyonunun olgular arasındaki sıklığı %43,8 olarak tespit edilmiş ve mutasyonun pozitifliği ile lenf nodu metastazı, yumuşak doku invazyonu, hastalığın ilerlemiş evrede olması ve tümörde kapsül bulunmama arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Aynı çalışmada

mutasyonunun pozitifliği ile cinsiyet ve yaş arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki/fark bulunamamıştır [151].

BRAF V600E mutasyonunun klinik ve demografik bazı özelliklerle ilişkisinin incelendiği bir takım çalışmalarda bu mutasyonu gösteren bireyler ile göstermeyen bireyler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilememiştir [138, 152].

BRAF V600E mutasyonunun PTK'li olgulardaki alt varyantlar açısından ilişkisinin incelendiği bir çalışmada klasik varyant 42 PTK olgusunun %67'sinde (28), folliküler varyant PTK tanısı almış 51 olgunun %12'sinde (6) bu mutasyon pozitif olarak tespit edilmiştir [155].

PTK tanısı almış 56 olgu ile yapılan bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonu, olguların %38'inde pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada mutasyonun sıklığı erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. Yaş artışının mutasyon sıklığını da artırdığı görülmüş ancak yaş ve mutasyon pozitifliği arasındaki bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [156].

İleri yaşla birlikte PTK tanısı almış olgularda *BRAF V600E* mutasyonu görülme sıklığının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [157-159].

Portekiz'de PTK tanısı almış 50 olgu ile yapılan bir çalışmada olguların %46'sında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Yine Portekiz'de yapılmış olan başka bir çalışmada 124 PTK'li olgunun %36'sında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu olgulardan 53 klasik varyant PTK'nin 28'i, 3 tall cell varyant PTK'nin 1'i mutasyon pozitif olarak tespit edilirken 32 folliküler varyant PTK'nin hiçbirinin *BRAF V600E* mutasyonuna sahip olmadığı bulunmuştur [160]

PTK tanısı almış 51 olgu ile yapılmış bir çalışmada olguların %76,5'inde *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak saptanmış ve aynı çalışmada mutasyonun varlığı ile cinsiyet, yaş, ekstratiroidel yayılım arasında istatistiki açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir [154].

Japonya'da klasik varyant PTK tasını bulunan 170 olgu ile yapılan bir çalışmada, olguların %29'unda *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak bulunmuştur [150].

PTK tanısı almış 119 olgu ile yapılan bir çalışmada, *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak 45 (%38) olgu tespit edilmiştir. Tüm çalışma grubu alt varyantı tanımlanmış olanlar açısından değerlendirildiğinde ise 53 klasik varyant PTK'nin 28'i (%53), 30 folliküler varyant PTK'nin 2'si (%7) ve 6 tall cell varyant PTK'nin 6'sı (%100) pozitif olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada ileri yaş ile mutasyonun varlığı arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir [62]. PTK tanısı almış 50 olgu ile yürütülen başka bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin sıklığı %62 olarak tespit edilirken alt varyantlar arasında ise klasik varyant PTK'li 18 olgunun %55,5'inde, folliküler varyant PTK'li 17 olgunun %52,9'unda ve tall cell varyant PTK'li 15 olgunun %80'inde mutasyon pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada folliküler varyant PTK'deki mutasyon pozitifliğinin literatüre göre yüksek tespit edildiği göze çarparken, bu yüksekliğin nedeninin çalışmaya alınan tüm olguların metastatik ve multifokal olmasından kaynaklı olabileceği belirtilmiştir [147].

PTK tanısı almış 107 olgu ile Kore'de yapılan bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı ile yaş, tümör çapı, lenf nodu metastazı ve tiroid kapsül invazyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamamıştır[146].

Amerika'da PTK tanısı almış 42 olgu ile yapılan bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin görülme sıklığı %62,2 olarak tespit edilirken, bu sıklık klasik varyant PTK'ler içinde %77,8 ve folliküler varyant PTK'ler içinde %33,3 olarak tespit edilmiştir[139].

70 klasik varyant PTK'li olgu ile yürütülen bir çalışmada olguların %83'ünde *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir[110]. Klasik varyant PTK'li olgularla yapılan başka bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliği %73,4 olarak bulunmuş ayrıca tümör büyüklüğü ve erkek cinsiyet ile mutasyon varlığı arasında ilişki tespit edilmiştir. Aynı çalışmada tümör sınırı, lenf nodu metastazı, multifokalite, tümör evresi ve yaş değişkenleri ile mutasyon pozitifliği arasında herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir[109].

Kore'de 107 PTK'li olgu ile yapılmış bir çalışmada, olguların %86'sında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiş ayrıca mutasyonun varlığı ile lenf nodu metastazı, tümör büyüklüğü, multisentrte, tümör yayılımı, cinsiyet ve yaş değişkenleri arasında bir ilişki bulunamamıştır [108].

Finlandiya ‘da PTK tanısı almış 461 olgunun on altı yıl boyunca takip edildiği bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliği ile cinsiyet, yaş, tümör çapı, lenf nodu metastazı ve vasküler invazyon arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir [107].

2010 yılında İtalya’da 20 mm çaptan düşük büyüklükte tümöre sahip 1060 PTK tanısı almış olgu ile yürütülen bir çalışmada, olguların %44,6’sında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Mutasyonun pozitifliğinin PTK’nin alt varyantlarındaki frekansının klasik varyant PTK’de % 69,4, folliküler varyant PTK’de % 21,3, tall cell varyant PTK’de %79,7 ve mikro PTK’lerde % 39,4 olarak tespit edilmiştir. *BRAF V600E* mutasyonu bu çalışmada literatürden farklı olarak, 45 yaş ve altındaki yaşlara sahip olgularda (%49,4), 45 yaş üstü olan olgulara (%40,8) göre daha sık görülmüştür. Mutasyonun pozitifliği ile olguların cinsiyeti arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilmezken, lenf nodu metastazı, ekstrasitroidel yayılım, tümör büyüklüğü, tümörde kapsül olmaması ve ileri evre hastalık ile anlamlı ilişkili olduğu tespit edilmiştir [106].

252 PTK tanısı almış olgu ile yapılan bir çalışmada olguların %74,6’sında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada mutasyonun varlığı ile ileri yaş, tümör kapsül invazyonu, tiroid kapsül invazyonu ve lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki bulunurken, tümör boyutu ve cinsiyet ile bir ilişki saptanamamıştır [103].

İspanya ‘da 2006 yılında PTK tanısı almış 67 olgu ile yapılmış olan çalışmada olguların %41,7’sinde *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Alt varyantlar açısından yapılan değerlendirmede her ne kadar olgulardaki klasik varyant PTK, folliküler varyant PTK’ye göre daha yüksek frekansta olsa da *BRAF V600E* mutasyonu ile iki PTK varyantı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark/ilişki olmadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde mutasyonun pozitifliği ile olguların yaşı, cinsiyeti ve tümörün metastaz yapmış olması arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark/ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmada önemli olarak *BRAF V600E* mutasyonunun, tiroid bezindeki sodyum-iyodür taşıyıcı proteini simporteri ekspresyonunda ve hücre zarına hedeflenmesinde aksaklıklar meydana getirdiği bu nedenle de hastalığı tedavi etmekte kullanılan İyot-131 (I-131) tutulumunu düşürdüğünden PTK’lerin nüks riskini ortaya koyabilecek bir tanı belirteci olduğu ileri sürülmüştür [43].

2012 yılında PTK tanısı almış 46 vaka ile Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde yürütülen bir çalışmada vakaların 40'ında (%86,95) *BRAF V600E* mutasyonu literatüre kıyasla oldukça yüksek şekilde pozitif olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada lenf nodu metastazı, kapsül invazyonu, ekstratiroidel invazyon ile *BRAF V600E* mutasyonunun pozitifliği arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir [83].

2009 yılında PTK tanısı almış 190 olgu ile yapılan bir çalışmada *BRAF V600E* mutasyonunun sıklığı %38 olarak tespit edilmiştir. Alt varyantlar açısından yapılan değerlendirmede mutasyonun pozitifliğinin, klasik varyant PTK'de %45, folliküler varyant PTK'de %12 ve tall cell varyant PTK'de %47 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada mutasyonun pozitifliği ile cinsiyet, yaş, tiroid dışına yayılım ve tümör kapsül invazyonu ile istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilemezken, lenf nodu metastazı ile anlamlı bir ilişki bulunarak, olgulara yapılacak cerrahi operasyon öncesinde risk belirlenebilmesi açısından *BRAF V600E* mutasyonunun analizinin yapılmasının faydalı olabileceği öne sürülmüştür [82].

Kanada'da 2021 yılında PTK tanısı almış 121 olgu ile yapılan bir çalışmada olgular tümör boyutuna göre iki gruba [birinci grup; tümör çapı 1 cm veya 1cm 'den küçük olan PTK (mikrokarsinom PTK), ikinci grup; tümör çapı 1,1 -1,5 cm olan (small PTK)] ayrılmıştır. Yapılan çalışma sonrasında birinci grupta *BRAF V600E* mutasyonu %43,6 olarak tespit edilirken, ikinci grupta %42,4 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada her iki grup içinde mutasyonun pozitifliği ile yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir ilişki tespit edilemezken ikinci grupta mutasyon pozitif olgular ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmuştur [161].

2021 yılında Ürdün'de PTK tanısı almış 128 olgunun, 50 ay boyunca takip edildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *BRAF V600E* mutasyonu olguların %71'inde pozitif olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada mutasyonun negatifliği ile tümör büyüklüğü arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki olduğu bulunmuştur. Mutasyona sahip olgularla diğerleri arasında yaş ve cinsiyet açısından fark yokken, lenf nodu metastazı ve tiroid dışı yayılım mutasyon pozitif olgularla ilişkilendirilmiştir [162].

Çin'de 2022 yılında yapılan bir çalışmada PTK tanılı 1257 olgunun 1102'sinde (%87,7) *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak tespit edilmiş ayrıca daha büyük tümör boyutu (>1

cm), ekstrasitroidal yayılım, ileri yaş ve lenf nodu metastazının mutasyonun pozitifliği ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [163].

2023 yılında Romanya’da PTK tanısı almış 127 olgu ile yürütülmüş bir çalışmada, *BRAF V600E* mutasyonu olguların %57,2’sinde pozitif olarak tespit edilmiş ve mutasyonun pozitifliği ile büyük tümör (> 40 mm), ekstrasitroidal yayılım, lenf nodu metastazı, ileri yaş (≥ 55) ve erkek cinsiyeti arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki bulunmuştur [164].

2024 yılında Hırvatistan’da yapılan bir çalışmada 173 PTK’li olgunun %60’ında *BRAF V600E* mutasyonu pozitif olarak bulunmuştur. Pozitif olan olgular ile ekstrasitroidal yayılım, kapsül infiltrasyonu, tümör invazyonu, anjiyoinvazyon arasında anlamlı ilişki bulunmuş, cinsiyet ve tümör çapı ile bu mutasyonun pozitifliği arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir [165].

Yapılan bu çalışmada *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı gibi mutasyon ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişkiye de rastlanmamıştır. Cinsiyet açısından yapılan bu değerlendirme daha önce yapılmış olan Lupi ve ark. (2007), Basolo ve ark. (2010), Shi ve ark. (2020), Bogatchenko ve ark. (2021), Al-Masri ve ark. (2021) ve Blazekovic ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumluluk gösterirken, erkek cinsiyet ile mutasyonun pozitifliği arasında ilişki bulan Nechifor-Boila ve ark. (2023) tarafından yapılmış olan çalışma ile çelişmektedir. Çalışmada *BRAF V600E* mutasyonuna göre yaş değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/fark bulunmuştur ($p < 0,050$). Tespit edilmiş olan bu farklılığın 45-64 ve 65 yaş üstünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yaş açısından elde edilen bu bulgu Nikiforova ve ark. (2003), Trovisco ve ark. (2006), Kim ve ark. (2012), Kebebew ve ark. (2007) ve Li ve ark. (2020), Ye ve ark. (2022) ve Nechifor-Boila ve ark. (2023) tarafından yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışma grubunda *BRAF V600E* mutasyonunun varlığı ile PTK varyantı değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/fark bulunmuştur ($p < 0,050$). PTK varyantı açısından tall cell ve klasik varyant tanısı almış olan olgularda bu mutasyonun pozitifliği daha sık görülmekte iken folliküler varyantta negatiflik daha sık görülmesine rağmen pozitifliğin de görülebileceği bulgusuna ulaşılmıştır. Benzer şekilde Namba ve ark. (2003), Cohen ve ark. (2004), Giannini ve ark. (2007) ve Rowe ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmalarda da alt varyantlar açısından bakıldığında Bu mutasyonun pozitifliğinin klasik varyant ve tall cell varyant PTK’lerde daha sık

görüldüğü tespit edilmiştir. Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonunu pozitifliği ile tümör kapsül varlığı arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark /ilişki olup olmadığına bakıldığında, tümör kapsül varlığı değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunmuştur ($p<0,050$). Elde edilen bu sonuç Lupi ve ark. (2007), Basolo ve ark. (2010) ve Blazekovic ve ark. (2024) yapmış olduğu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Diğer bir veri olan tümör kapsül invazyonu ile *BRAF V600E* mutasyonu arasında istatistiksel açıdan bir ilişki/fark olup olmadığına bakıldığında Xing ve ark. (2009), Kurt ve ark. (2012) ve Li ve ark. (2020) yapmış olduğu çalışmalar ile uyumlu şekilde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunamamıştır. Bu çalışmadaki olgu grubunda hem tümör kapsül invazyonu varlığında hem de tümör kapsül invazyonu yokluğunda bu mutasyonun pozitifliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada lenf nodu metastazı değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliği ile istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ($p<0,050$) ve lenf nodu metastazına sahip olgularda *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Lenf nodu metastazı açısından elde edilen bu bulgular daha önce Lupi ve ark. (2007), Basolo ve ark. (2010), Kim ve ark.(2012), Li ve ark.(2020), Bogatchenko ve ark.(2021), Al-Masri ve ark. (2021), Ye ve ark. (2022) ve Nechifor-Boila ve ark. (2023) tarafından yapılmış çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Olgulardaki *BRAF V600E* mutasyonuna göre vasküler invazyon varlığı değişkeni açısından bir fark /ilişki olup olmadığına bakıldığında ise vasküler invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunamamıştır. Hem vasküler invazyona sahip olan hem de vasküler invazyonu olmayan olgularda *BRAF V600E* açısından pozitiflik ve negatiflik görülebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Vasküler invazyon açısından elde edilen bu sonuç Pelttari ve ark.(2012) tarafından yapılmış olana çalışmadan elde edilen verilerle benzerlik göstermekte ancak mutasyonun pozitifliği ile vasküler invazyon arasında anlamlı ilişki bulan, Blazekovic ve ark. (2024) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile çelişmektedir. Yapılan bu çalışmada, Xing ve ark. (2009) ve Kurt ve ark. (2012) tarafından yapılmış olan çalışma ile benzer olarak, yumuşak doku invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ($p<0,050$) ve yumuşak doku invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edildiği görülmüştür. Bu çalışmada yer alan olgularda tiroid kapsül invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ve tiroid kapsül invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin daha yüksek oranda ortaya çıktığı görülmüştür. Bu çalışmada *BRAF V600E* mutasyon varlığı

ve tiroid kapsül invazyonu arasındaki ilişki istatistiksel açıdan incelendiğinde, tiroid kapsül invazyon değişkeni açısından *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki/ fark bulunduğu ($p<0,050$) ve tiroid kapsül invazyonu varlığında *BRAF V600E* mutasyonu pozitifliğinin daha yüksek oranda tespit edildiği görülmüştür. Elde edilen bu bulgu daha önce Li ve ark.(2020) ve Blazekovic ve ark. (2024) tarafından yapılmış olan çalışmanın sonuçları ile benzerlik gösterirken, Ahn ve ark.(2012) tarafından yapılan çalışma ile çelişmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, daha önce yapılmış olan çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen kimi sonuçlar literatür ile uyumlu iken kimi sonuçların ise literatürden farklı olduğu görülmektedir. Ortaya çıkan bu farklılığın, üzerinde çalışılan vaka sayılarındaki değişkenlikten, olgu gruplarının farklı etnik kökene sahip olunmasından, iyot eksikliği açısından endemik olan coğrafyalardan olguların olabileceğinden ve laboratuvarlar arası farklılıklardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmaya ait ilk akla gelen sınırlama çalışmanın retrospektif olarak tasarlanmış olmasından kaynaklı olabileceğidir. Diğer sınırlamanın ise demografik ve klinik verilerin elde edilmesindeki takip süresinde bir standart olmaması ve çalışmanın FFPE dokulardan elde edilen DNA materyali ile yapılmış olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. İnce iğne aspirasyon biyopsilerinden elde edilen sitoloji örneklerinden parafine gömülmesi ile saklanmış örneklerden realtime PZR reaksiyonları için DNA elde edilmeye çalışılmış bu aşamada zaten yeteri miktarda olmayan dokudan bir de parafinle saklamanın etkisi ile yeterli DNA elde edilememiş ve bazı örnekler değerlendirme dışı bırakılmak zorunda kalınmıştır. Buna karşın bu çalışmanın güçlü yanı ise, çalışmanın Türkiye'nin birçok şehrinden olgu kabul edilen Ankara gibi bir merkezden alınan örneklerle yapılmış olması ve ülkemiz popülasyonunda gerçekleştirilmiş yüksek olgu sayısına sahip bir çalışma olması ve mutasyonun varlığının, demografik, klinik verilerle istatistiksel açıdan analizinin de yapılmış olması ayrıca mutasyon analizinde yanlış pozitifliğe fırsat vermeyen realtime PZR tekniğinin kullanılmış olmasıdır.

Elde edilen tüm bu bulgulardan hareketle PTK'de tek başına *BRAF V600E* mutasyonu tespitinin prognostik belirteç olarak kullanılamayacağı, demografik ve klinik özelliklerin, morfoloji ve genlerde meydana gelen yeniden düzenlemelerle ortaya çıkan değişikliklerle birlikte değerlendirilerek prognozun değerlendirilmesi yaklaşımının akılcı olduğu düşünülmektedir. Moleküler belirteçlerin tiroid kanserinde rutin olarak kullanılmasına geçilmeden buradan elde edilen sonucun klinik açıdan yararlı olup olmayacağı ile ilgili

olarak daha geniş olgu grupları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışmalarda, benzer laboratuvar koşullarında, mutasyon tespitinde aynı teknikler kullanılarak, bir standart geliştirilerek elde edilmiş demografik ve klinik verilerin sınanması ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu gibi, tiroid kanseri moleküler patogenezinde rol alan *BRAF V600E* dışındaki yolların da bilinmesinin hastalığın tanı, takip, prognoz ve tedavisine yaklaşıma katkı sunabileceği düşünülmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak, ülkemizde çok merkezli olarak tasarlanmış çalışmalar ile *BRAF V600E* mutasyonu profilinde daha doğru sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. American Cancer Society. (2007). *Cancer facts & figures*. Atlanta: American Cancer Society, 4, 10,17,18.
2. Wells, S. A. (2008). Cancer of the endocrine system. In V. T. Devita, S. Hellman and S. A. Rosenberg (Eds.), *Cancer: Principles and practice of oncology* (8th Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 1655-1682.
3. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 277-300.
4. Schulz, W. A. (2007). *Molecular biology of human cancers*. Dordrecht: Springer, 508.
5. Arslan, M., Delibaşı, T. ve Şahin, M. (2011). Thyroid cancer. *İç Hastalıkları Dergisi*, 18, 41-48.
6. Nechifor-Boila, A., Decaussin-Petrucci, M., Gazzo, S., Pascanu, I., and Borda, A. (2012). Detection of BRAF V600E mutation in thyroid fine-needle aspiration specimens by High Resolution Melting (HRM) analysis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 53(2), 263-267.
7. Schaaf, C. P., Zschocke, J., and Potocki, L. (2012). *Human genetics: from molecules to medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 90.
8. Zimmermann, A. K., Camenisch, U., Rechsteiner, M. P., Bode-Lesniewska, B., and Rössle, M. (2013). Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathology*, 122(1), 48-58.
9. Burthem, J., and Cawley, J. C. (1994). The bone marrow fibrosis of hairy-cell leukemia is caused by the synthesis and assembly of a fibronectin matrix by the hairy cells. *Blood*, 83(2), 497–504.
10. Arons, E., Suntum, T., Stetler-Stevenson, M., and Kreitman, R. J. (2009). VH4-34+ hairy cell leukemia, a new variant with poor prognosis despite standard therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(21), 4687-4695.
11. Badalian-Very, G., Vergilio, J. A., Degar, B. A., MacConaill, L. E., Brandner, B., Calicchio, M. L., Kou, F. C., Ligon, A. H., Stevenson, K. E., Kehoe, S. M., Garraway, L. A., Hahn, W. C., Meyerson, M., Fleming, M. D., and Rollins, B. J. (2010). Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(11), 1919-1923.
12. Basso, K., Liso, A., Tiacci, E., Benedetti, R., Pulsoni, A., Foa, R., Di Raimondo, F., Ambrosetti, A., Califano, A., Klein, U., Favera, R. D., and Falini, B. (2004). Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 59-68.

13. Blombery, P. A., Wong, S. Q., Hewitt, C. A., Dobrovic, A., Maxwell, E. L., Juneja, S., Grigoriadis, G., and Westerman, D. A. (2012). Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica*, 97(5), 780.
14. Bouroncle, B. A., Wiseman, B. K., and Doan, C. A. (1958). Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 13(7), 609-630.
15. Else, M., Dearden, C. E., Matutes, E., Garcia-Talavera, J., Rohatiner, A. Z., Johnson, S. A., O'Connor, N. T. J., Haynes, A., Osuji, N., Forconi, F., Lauria, F., and Catovsky, D. (2009). Long-term follow-up of 233 patients with hairy cell leukaemia, treated initially with pentostatin or cladribine, at a median of 16 years from diagnosis. *British Journal of Haematology*, 145(6), 733-740.
16. Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., and Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 924-935.
17. Strensward, J., and Clark, D. (2004). Palliative medicinea global perspective. In D. Doyle, G. Hanks, N. Cherny and K. Camlan (Eds.), *Oxford textbook of palliative medicine*. (3rd edition). Oxford: Oxford University Press, 1119- 224.
18. İnternet: The American Cancer Society. (2022). *Cancer*. URL: www.cancer.org, Son Erişim Tarihi: 14.02.2022.
19. Kumar, V., Abbas, A. K., and Aster, J. C. (2014). *Robbins & cotran pathologic basis of disease* (Ninth edition). Philadelphia: Elsevier, 1-28.
20. Curry, S. J., Byers, T., and Hewitt, M. (2003). Lifestyle behaviors contributing to the burden of cancer. In S. Curry, T. Byers and M. Hewitt (Eds), *Fulfilling the potential of cancer prevention and early detection*. Washington: The National Academies Press, 40-86.
21. Thun, M. J., Day-Lally, C., Myers, D. G., Calle, E. E., Flanders, W. D., Zhu, B. P., Namboodiri, M. M., and Heath, C. W. (1997). Trends in tobacco smoking and mortality from cigarette use in Cancer Prevention Studies I (1959 through 1965) and II (1982 through 1988). In D. Burns, L. Garfinkel and J. Samet (Eds), *Changes in cigarette-related disease risks and their implications for prevention and control*, Washington: National Institute of Health, 383-411.
22. Adler, L. (1912). *Primary malignant growth of the lungs and bronchi*. New York: Longmans-Green, 3-11.
23. Sasco, A. J., Secretan, M. B., and Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45(2), 3-9.
24. Brownson, R. C., Novotny, T. E., and Perry, M. C. (1993). Cigarette smoking and adult leukemia: a meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 153(4), 469-475.
25. Allen, N. E., Beral, V., Casabonne, D., Kan, S. W., Reeves, G. K., Brown, A., and Green, J. (2009). Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(5), 296-305.

26. Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M. J., Brunekreef, B., Xun, W. W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Sommar, J., Forsberg, B., Modig, L., Oudin, A., Oftedal, B., Schwarze, P. E., Nafstad, P., Faire, U. D., Pedersen, N. L., Ostenson, C. G., Fratiglioni, L., Penell, J., Korek, M., Pershagen, G., Eriksen, K. T., Sørensen, M., Tjønneland, A., Ellermann, T., Eeftens, M., Peeters, P. H., Meliefste, K., Wang, M., Bueno-de-Mesquita, B., Key, T. J., de Hoogh, K., Concin, H., Nagel, G., Vilier, A., Sara Grioni, Krogh, V., Tsai, M. Y., Ricceri, F., Sacerdote, C., Galassi, C., Migliore, E., Ranzi, A., Cesaroni, G., Badaloni, C., Forastiere, F., Tamayo, I., Amiano, P., Dorronsoro, M., Trichopoulou, A., Bamia, C., Vineis, P., Hoek, G., and Hoek, G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*, 14(9), 813-822.
27. Zeegers, M. P. A., Swaen, G. M. H., Kant, I., Goldbohm, R. A., and Van den Brandt, P. A. (2001). Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occupational and Environmental Medicine*, 58(9), 590-596.
28. Spirtas, R., Heineman, E. F., Bernstein, L., Beebe, G. W., Keehn, R. J., Stark, A., Harlow, B. L., and Benichou, J. (1994). Malignant mesothelioma: attributable risk of asbestos exposure. *Occupational and Environmental Medicine*, 51(12), 804-811.
29. Armstrong, B. K., and Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 63(1-3), 8-18.
30. Koh, D., Wang, H., Lee, J., Chia, K. S., Lee, H. P., and Goh, C. L. (2003). Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968–97. *British Journal of Dermatology*, 148(6), 1161-1166.
31. Internet: Valentin, J. (Ed.). (2007). *The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection*. URL: [https://icrp.org/docs/ICRP_Publication_103-Annals_of_the_ICRP_37\(2-4\)-Free_extract.pdf](https://icrp.org/docs/ICRP_Publication_103-Annals_of_the_ICRP_37(2-4)-Free_extract.pdf), 16.07.2024: 13:44.
32. Feinendegen, L. E. (2005). Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *The British Journal of Radiology*, 78(925), 3-7.
33. Rapp, K., Schroeder, J., Klenk, J., Stoehr, S., Ulmer, H., Concin, H., Diem, G., Oberaigner, W., and Weiland, S. K. (2005). Obesity and incidence of cancer: a large cohort study of over 145 000 adults in Austria. *British Journal of Cancer*, 93(9), 1062-1067.
34. Kim, Y. I., and Mason, J. B. (1996). Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. *Nutrition Reviews*, 54(9), 259-279.
35. Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet*, 2, 1129-1233.

36. Herceg, Z., and Hainaut, P. (2007). Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 1(1), 26-41.
37. Cortez, C. C., and Jones, P. A. (2007). Chromatin, cancer and drug therapies: Mutation research/ cancer detection, diagnosis and prognosis. *Molecular Oncology*, 1, 26-41.
38. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
39. Rosai, J., and Tallini, G. (2011). Thyroid gland. In J. Rosai (Ed.), *Rosai and Ackerman's surgical pathology*, (10th edition.), China, Mosby Elsevier 487-564.
40. Dumont, J. E., Lamy, F., Roger, P., and Maenhaut, C. (1992). Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Reviews*, 72(3), 667-697.
41. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2009). *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. (7th edition). Philadelphia: Elsevier Saunders, 1178-80.
42. Sternberg, S.S. (Ed.). (1992). *Histology for pathologist*. New York: Raven Press, 301-10.
43. Kim, S. J., Lee, K. E., Myong, J. P., Park, J. H., Jeon, Y. K., Min, H. S., Park, S. Y., Jung, K. C., Koo, D. H. and Youn, Y. K. (2012). BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer. *World Journal of Surgery*, 36, 310-317.
44. Riesco-Eizaguirre, G., Gutierrez-Martinez, P., García-Cabezas, M. A., Nistal, M., and Santisteban, P. (2006). The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocrine-Related Cancer*, 13(1), 257-269.
45. Katoh, R., Bray, C. E., Suzuki, K., Komiyama, A., Hemmi, A., Kawaoi, A., Oyama, T., Sugai, T., and Sasou, S. (1995). Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Human Pathology*, 26(2), 139-146.
46. Sreelekha, T. T., Pradeep, V. M., Vijayalakshmi, K., Belthazar, A., Chellam, V. G., Nair, M. B., and Pillai, M. R. (2000). In situ apoptosis in the thyroid. *Thyroid*, 10(2), 117-122.
47. Soares, P., and Sobrinho-Simões, M. (1994). Proliferative activity of human thyroid tumors evaluated by proliferating cell nuclear antigen/cyclin immunohistochemical studies. *Cancer*, 73(11), 2879-2881.
48. Yoshida, A., Nakamura, Y., Imada, T., Asaga, T., Shimizu, A., and Harada, M. (1999). Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Surgery Today*, 29, 204-208.

49. Moore, D., Ohene-Fianko, D., Garcia, B., and Chakrabarti, S. (1998). Apoptosis in thyroid neoplasms: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology*, 32(1), 35-42.
50. Davies, L., and Welch, H. G. (2006). Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *Jama*, 295(18), 2164-2167.
51. Simard, E. P., Ward, E. M., Siegel, R., and Jemal, A. (2012). Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 62(2), 118-128.
52. İnternet: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. (2015). *Türkiye Halk Sağlığı kanser istatistikleri-2015*. URL: <https://hsqm.saglik.gov.tr>, 16.07.2024: 13:44.
53. Enewold, L., Zhu, K., Ron, E., Marrogi, A. J., Stojadinovic, A., Peoples, G. E., and Devesa, S. S. (2009). Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(3), 784-791.
54. Davies, L., Morris, L. G., Haymart, M., Chen, A. Y., Goldenberg, D., Morris, J., Ogilvie, J. B., Terris, D. J., Netterville, J., Wong, R. J., and Randolph, G. (2015). AACE endocrine surgery scientific committee 2015 American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology disease state clinical review: the increasing incidence of thyroid cancer. *Endocrine Practice*, 21(6), 686-696.
55. İnternet: The American Cancer Society. (2015). Cancer. URL: www.cancer.org, 16.07.2024: 13:44.
56. Garcia, M., Jemal, A., Ward, E. M., Center, M. M., Hao, Y., Siegel, R. L., and Thun, M. J. (2011). *Global cancer facts & figures 2007*. Atlanta, GA: American Cancer Society, 1, 52.
57. İzmirli, M., Altın, S., Dernek, B. O. ve Ünsal, M. (2007). SSK Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Merkezi'nin 1999-2004 yılları kanser istatistikleri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 172-182.
58. Eser, S., Yakut, C., Özdemir, R., Karakılınç, H., Özalan, S., Marshall, S. F., Karaoğlanoğlu, O., Anbarcioğlu, Z., Üçüncü, N., Akin, Ü., Özen, E., Özgül, N., Anton-Culver, H., and Tuncer, M. (2010). Cancer incidence rates in Turkey in 2006: a detailed registry based estimation. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 11(6), 1731-1739.
59. Carling, T., and Udelsman, R. (2005). Thyroid tumors. In V. T. DeVita, S. Hellman and S. A. Rosenberg (Eds.), *Cancer: Principles and practice of oncology*. (7th Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 502- 509.
60. Hundahl, S. A., Fleming, I. D., Fremgen, A. M., and Menck, H. R. (1998). A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 83(12), 2638-2648.

61. Schonfeld, S. J., Lee, C., and De Gonzalez, A. B. (2011). Medical exposure to radiation and thyroid cancer. *Clinical Oncology*, 23(4), 244-250.
62. Rubin, R., and Strayer, D. S. (2008). Rubin's pathology: Clinicopathologic foundations of medicine. the endocrine system. *Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) Is the Most Common Thyroid Cancer*, 21, 951-952.
63. Xing, M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12(2), 245-262.
64. Xing, M. (2013). Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(3), 184-199.
65. Dumont, J. E., Maenhaut, C., Pirson, I., Baptist, M., and Roger, P. P. (1991). Growth factors controlling the thyroid gland. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 5(4), 727-754.
66. Fagin, J. A. (1994). Molecular genetics of human thyroid neoplasms. *Annual Review of Medicine*, 45(1), 45-52.
67. Farid, N. R., Shi, Y., and Zou, M. (1994). Molecular basis of thyroid cancer. *Endocrine Reviews*, 15(2), 202-232.
68. Frauman, A. G., and Moses, A. C. (1990). Oncogenes and growth factors in thyroid carcinogenesis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 19(3), 479-493.
69. Ringel, M. D. (2000). Molecular diagnostic tests in the diagnosis and management of thyroid carcinoma. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1, 173-181.
70. Said, S., Schlumberger, M., and Suarez, H. G. (1994). Oncogenes and anti-oncogenes in human epithelial thyroid tumors. *Journal of Endocrinological Investigation*, 17(5), 371-379.
71. Suárez, H. G. (1998). Genetic alterations in human epithelial thyroid tumours. *Clinical Endocrinology*, 48(5), 531-546.
72. Wright, P. A., Lemoine, N. R., Goretzki, P. E., Wyllie, F. S., Bond, J., Hughes, C., Röher, H. D., Williams, E. D., and Wynford-Thomas, D. (1991). Mutation of the p53 gene in a differentiated human thyroid carcinoma cell line, but not in primary thyroid tumours. *Oncogene*, 6(9), 1693-1697.
73. Wynford-Thomas, D. (1997). Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. *Hormone Research in Paediatrics*, 47(4-6), 145-157.
74. Fagin, J. A. (2002). Minireview: branded from the start—distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid. *Molecular Endocrinology*, 16(5), 903-911.

75. Kroll, T. G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C. J., Mueller, E., Spiegelman, B. M., and Fletcher, J. A. (2000). PAX8-PPAR γ 1 fusion in oncogene human thyroid carcinoma. *Science*, 289(5483), 1357-1360.
76. Vasko, V., Ferrand, M., Di Cristofaro, J., Carayon, P., Henry, J. F., and De Micco, C. (2003). Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(6), 2745-2752.
77. Cheung, L., Messina, M., Gill, A., Clarkson, A., Learoyd, D., Delbridge, L., Wendworth, J., Philips, J., Clifton-Bligh, R., and Robinson, B. G. (2003). Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 354-357.
78. Peyssonnaud, C., and Eychène, A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the Cell*, 93(1-2), 53-62.
79. Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W. C., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R., and Futreal, P. A. (2002). Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
80. Asa, S. L. (2017). The evolution of differentiated thyroid cancer. *Pathology*, 49(3), 229-237.
81. Acquaviva, G., Visani, M., Repaci, A., Rhoden, K. J., de Biase, D., Pession, A., and Giovanni, T. (2018). Molecular pathology of thyroid tumours of follicular cells: a review of genetic alterations and their clinicopathological relevance. *Histopathology*, 72(1), 6-31.
82. Xing, M., Clark, D., Guan, H., Ji, M., Dackiw, A., Carson, K. A., Kim, M., Tufaro, A., Ladenson, P., Zeiger, M., and Tufano, R. (2009). BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(18), 2977-2982.
83. Kurt, B., Yalçın, S., Alagöz, E., Karşlıoğlu, Y., Yigit, N., Günel, A., and Deveci, M. S. (2012). The relationship of the BRAF V600E mutation and the established prognostic factors in papillary thyroid carcinomas. *Endocrine Pathology*, 23, 135-140.
84. Mills, S. E., Greenson, J. K., Hornick, J. L., Longacre, T. A., and Reuter, V. E. (2015). *Sternberg's diagnostic surgical pathology*. (6th edition). Şehir: Wolters Klover Health, 533-594.
85. Tielens, E. T., Sherman, S. I., Hruban, R. H., and Ladenson, P. W. (1994). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. *Cancer*, 73(2), 424-431.

86. Zidan, J., Karen, D., Stein, M., Rosenblatt, E., Basher, W., and Kuten, A. (2003). Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: Clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(5), 1181-1185.
87. Lloyd, R. V., Osamura, R. Y. G., Kloppel, R. J. (2017). *WHO classification of tumors of endocrine organs*. (4th edition). Lyon: International Agency for Research on Cancer, 66–67.
88. Baloch, Z. W., and LiVolsi, V. A. (2018). Special types of thyroid carcinoma. *Histopathology*, 72(1), 40-52.
89. Nikiforov, Y. E., Erickson, L. A., Nikiforova, M. N., Caudill, C. M., and Lloyd, R. V. (2001). Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical–pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(12), 1478-1484.
90. Santoro, M., and Carlomagno, F. (2016). Pathogenesis of thyroid carcinoma. In P. Vitti and L. Hegedus (Eds.), *Thyroid diseases, endocrinology*. Cham: Springer, 3-32.
91. Hsiao, S. J., and Nikiforov, Y. E. (2014). Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocrine-Related Cancer*, 21(5), 301-313.
92. Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E., and Fagin, J. A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Research*, 63(7), 1454-1457.
93. Jhiang, S. M., Sagartz, J. E., Tong, Q., Parker-Thornburg, J., Capen, C. C., Cho, J. Y., Xing, S., and Ledent, C. (1996). Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*, 137(1), 375-378.
94. Santoro, M., Chiappetta, G., Cerrato, A., Salvatore, D., Zhang, L., Manzo, G., Picone, A., Portella, G., Santelli, G., Vecchio, G., and Fusco, A. (1996). Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*, 12(8), 1821-1826.
95. Jazdzewski, K., Murray, E. L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D. R., and De La Chapelle, A. (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(20), 7269-7274.
96. Jazdzewski, K., Liyanarachchi, S., Swierniak, M., Pachucki, J., Ringel, M. D., Jarzab, B., and De la Chapelle, A. (2009). Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1502-1505.

97. Gudmundsson, J., Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Jonasson, J. G., Sigurdsson, A., Bergthorsson, J. T., He, H., Blondal, T., Geller, F., Jakobsdottir, M., Magnusdottir, D. N., Matthiasdottir, S., Stacey, S. N., Skarphedinsson, O. B., Helgadottir, H., Li, W., Nagy, R., Aguillo, E., Faure, E., Prats, E., Saez, B., Martinez, M., Eyjolfsson, G. I., Bjornsdottir, U. S., Holm, H., Kristjansson, K., Frigge, M. L., Kristvinsson, H., Gulcher, J. R., Jonsson, T., Rafnar, T., Hjartarsson, H., J., Mayordomo, I., de la Chapelle, A., Hrafnkelsson, J., Thorsteinsdottir, U., and Kong, A., and Stefansson, K. (2009). Common variants on 9q22. 33 and 14q13. 3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nature Genetics*, 41(4), 460-464.
98. He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M., de la Chapelle, A., and De La Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 19075-19080.
99. Di Cristofano, A., and Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 100(4), 387-390.
100. Oler, G., Ebina, K. N., Michaluart Jr, P., Kimura, E. T., and Cerutti, J. (2005). Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis. *Clinical Endocrinology*, 62(4), 509.
101. Knauf, J. A., Ma, X., Smith, E. P., Zhang, L., Mitsutake, N., Liao, X. H., Refetoff, S., Nikiforov, Y. E., Fagin, J. A., and Fagin, J. A. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Research*, 65(10), 4238-4245.
102. Xing, M., Westra, W. H., Tufano, R. P., Cohen, Y., Rosenbaum, E., Rhoden, K. J., Carson, K. A., Vasko, V., Larin, A., Tallini, G., Tolaney, S., Holt, E. H., Hui, P., Umbricht, C. B., Basaria, S., Ewertz, M., Tufaro, A. P., Califano, J. A., Ringel, M. D., Zeiger, M. A., Sidransky, D., Ladenson, P. W., Ladenson, P. W. (2005). BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(12), 6373-6379.
103. Li, G. Y., Tan, H. L., Chen, P., Hu, H. Y., Liu, M., Ou-Yang, D. J., Khushbu, R. A., Pun, D., Li, J. D., Zhang, Z. P., Yang, Q., Huang, P., and Chang, S. (2020). Predictive factors for level V lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma with BRAFV600E mutation and clinicopathological features. *Cancer Management and Research*, 3371-3378.
104. Salerno, P., De Falco, V., Tamburrino, A., Nappi, T. C., Vecchio, G., Schweppe, R. E., Bollag, G., Santoro, M., and Salvatore, G. (2010). Cytostatic activity of adenosine triphosphate-competitive kinase inhibitors in BRAF mutant thyroid carcinoma cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(1), 450-455.
105. Ball, D. W. (2010). Selectively targeting mutant BRAF in thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(1), 60-61.

106. Basolo, F., Torregrossa, L., Giannini, R., Miccoli, M., Lupi, C., Sensi, E., Berti, P., Elisei, R., Vitti, P., Baggiani, A., and Miccoli, P. (2010). Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95(9), 4197-4205.
107. Pelttari, H., Schaln-Jäntti, C., Arola, J., Löyttyniemi, E., Knuutila, S., and Välimäki, M. J. (2012). BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. *Apmis*, 120(5), 380-386.
108. Chung, K. W., Yang, S. K., Lee, G. K., Kim, E. Y., Kwon, S., Lee, S. H., Park, D. J., Lee, H. S., Cho, B. Y., Lee, E. S., and Kim, S. W. (2006). Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Clinical Endocrinology*, 65(5), 660-666.
109. Kim, T. Y., Kim, W. B., Rhee, Y. S., Song, J. Y., Kim, J. M., Gong, G., Lee, S., Kim, S. Y., Kim, S. C., Hong, S. J., and Shong, Y. K. (2006). The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*, 65(3), 364-368.
110. Kim, K. H., Kang, D. W., Kim, S. H., Seong, I. O., and Kang, D. Y. (2004). Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Medical Journal*, 45(5), 818-821.
111. Mills, S. E. (2004). Sternberg's diagnostic surgical pathology (4th edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 564-572.
112. Quiros, R. M., Ding, H. G., Gattuso, P., Prinz, R. A., and Xu, X. (2005). Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 103(11), 2261-2268.
113. Hardin, H., Montemayor-Garcia, C., and Lloyd, R. V. (2013). Thyroid cancer stem-like cells and epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancers. *Human Pathology*, 44(9), 1707-1713.
114. Çakır, B. (Editör). (2020). *Tiroid kanseri güncel yaklaşım*. Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 25.
115. Takano, T., and Amino, N. (2002). Cancer-specific mRNAs in thyroid carcinomas: detection, use, and their implication in thyroid carcinogenesis. *Endocrine Journal*, 49(2), 97-107.
116. Takano, T. (2014). Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: A modified theory based on recent evidence. *Endocrine Journal*, 61(4), 311-320.
117. Chmielik, E., Rusinek, D., Oczko-Wojciechowska, M., Jarzab, M., Krajewska, J., Czarniecka, A., and Jarzab, B. (2018). Heterogeneity of thyroid cancer. *Pathobiology*, 85(1-2), 117-129.

118. Prete, A., Borges de Souza, P., Censi, S., Muzza, M., Nucci, N., and Sponziello, M. (2020). Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 102.
119. Kim, E. K., and Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
120. Pertuit, M., Barlier, A., Enjalbert, A., and Gérard, C. (2009). Signalling Pathway Alterations in Pituitary Adenomas: Involvement of Gs α , cAMP and Mitogen-Activated Protein Kinases. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(11), 869-877.
121. Kierszenbaum, A. L. (2007). Histology and cell biology: An introduction to pathology. (Second edition). Canada: Elsevier, 85-104.
122. Gustafson, S., Zbuk, K. M., Scacheri, C., and Eng, C. (2007). Cowden syndrome. *Seminars in Oncology*, 34(5), 428-434.
123. Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21-44.
124. Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal*, 351(2), 289-305.
125. Mascaux, C., Iannino, N., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., Haller, A., Lothaire, P., Meert, A. P., Lafitte, J. J., and Sculier, J. P. (2005). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 92(1), 131-139.
126. Dergham, S. T., Dugan, M. C., Kucway, R., Du, W., Kamarauskiene, D. S., Vaitkevicius, V. K., Crissman, J. D., and Sarkar, F. H. (1997). Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Pancreatology*, 21, 127-143.
127. Hsu, C. Y., Bristow, R., Cha, M. S., Wang, B. G., Ho, C. L., Kurman, R. J., Wang, T. L., and Shih, I. M. (2004). Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 10(19), 6432-6436.
128. Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., and Zhang, X. F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Progress in Hormone Research*, 56, 127-155.
129. Greco, A., Pierotti, M. A., Bongarzone, I., Pagliardini, S., Lanzi, C., and Della Porta, G. (1992). TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, 7(2), 237-242.
130. Pratilas, C. A., and Solit, D. B. (2010). Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clinical Cancer Research*, 16(13), 3329-3334.

131. McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M., and Franklin, R. A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263-1284.
132. Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
133. Bhaijee, F., and Nikiforov, Y. E. (2011). Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocrine Pathology*, 22, 126-133.
134. Minoo, P., Moyer, M. P., and Jass, J. R. (2007). Role of BRAF-V600E in the serrated pathway of colorectal tumourigenesis. *The Journal of Pathology*, 212(2), 124-133.
135. Nikiforov, Y. E. (2004). Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocrine Pathology*, 15(4), 319-327.
136. Hagan, S., Orr, M. C., and Doyle, B. (2013). Targeted therapies in colorectal cancer—an integrative view by PPPM. *Epma Journal*, 4(1), 1-16.
137. Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., Louis, D. N., Korshunov, A., Pfister, S., Hartmann, C., Paulus, W., Reifenberger, G., and von Deimling, A. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathologica*, 121, 397-405.
138. Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., and Buttitta, F. (2011). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(26), 3574-3579.
139. Rowe, L. R., Bentz, B. G., and Bentz, J. S. (2007). Detection of BRAF V600E activating mutation in papillary thyroid carcinoma using PCR with allele-specific fluorescent probe melting curve analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 60(11), 1211-1215.
140. Xing, M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Viola, D., Elisei, R., Bendlova, B., Yip, L., Mian, C., Vianello, F., Tuttle, R. M., Robenshtok, E., Fagin, J. A., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Czarniecka, A., Jarzab, B., O'Neill, C. J., Sywak, M. S., Lam, A. K., Riesco-Eizaguirre, G., Santisteban, P., Nakayama, H., Tufano, R. P., Pai, S. I., Zeiger, M. A., Westra, W. H., Clark, D. P., Clifton-Bligh, R., Sidransky, D., Ladenson, P. W., and Sykorova, V. (2013). Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama*, 309(14), 1493-1501.

141. Xing, M., Alzahrani, A. S., Carson, K. A., Shong, Y. K., Kim, T. Y., Viola, D., Elisei, R., Bendlová, B., Yip, L., Mian, C., Vianello, F., Tuttle, R. M., Robenshtok, E., Fagin, J. A., Puxeddu, E., Fugazzola, L., Czarniecka, A., Jarzab, B., O'Neill, C. J., Sywak, M. S., Lam, A. K., Riesco-Eizaguirre, G., Santisteban, P., Nakayama, H., Clifton-Bligh, R., Tallini, G., Holt, E. H., and Sýkorová, V. (2015). Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(1), 42-50.
142. Ito, Y., Yoshida, H., Maruo, R., Morita, S., Takano, T., Hirokawa, M., Yabuta, T., Fukushima, M., Inoue, H., Tomoda, C., M., Kihara, Uruno, T., Higashiyama, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., and Miyauchi, A. (2009). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocrine Journal*, 56(1), 89-97.
143. Sancisi, V., Nicoli, D., Ragazzi, M., Piana, S., and Ciarrocchi, A. (2012). BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(9), E1745-E1749.
144. Bongarzone, I., Vigneri, P., Mariani, L., Collini, P., Pilotti, S., and Pierotti, M. A. (1998). RET/NTRK1 rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: correlation with clinicopathological features. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(1), 223-228.
145. Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R., and Cancer Genome Project. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6), 855-867.
146. Ahn, D., Park, J. S., Sohn, J. H., Kim, J. H., Park, S. K., Seo, A. N., and Park, J. Y. (2012). BRAFV600E mutation does not serve as a prognostic factor in Korean patients with papillary thyroid carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 39(2), 198-203.
147. Giannini, R., Ugolini, C., Lupi, C., Proietti, A., Elisei, R., Salvatore, G., Berti, P., Materazzi, G., Miccoli, P., Santoro, M., and Basolo, F. (2007). The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(9), 3511-3516.
148. Cohen, Y., Xing, M., Mambo, E., Guo, Z., Wu, G., Trink, B., Beller, U., Westra, W. H., Ladenson, P. W., and Sidransky, D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(8), 625-627.
149. Fukushima, T., Suzuki, S., Mashiko, M., Ohtake, T., Endo, Y., Takebayashi, Y., Sekikawa, K., Hagiwara, K., and Takenoshita, S. (2003). BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene*, 22(41), 6455-6457.

150. Namba, H., Nakashima, M., Hayashi, T., Hayashida, N., Maeda, S., Rogounovitch, T. I., Ohtsuru, A., Saenko, V. A., Kanematsu, T., and Yamashita, S. (2003). Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(9), 4393-4397.
151. Lupi, C., Giannini, R., Ugolini, C., Proietti, A., Berti, P., Minuto, M., Materazzi, G., Elisei, R., Santoro, M., Miccoli, P., and Basolo, F. (2007). Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(11), 4085-4090.
152. Kim, K. H., Suh, K. S., Kang, D. W., and Kang, D. Y. (2005). Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. *Pathology International*, 55(9), 540-545.
153. Fugazzola, L., Puxeddu, E., Avenia, N., Romei, C., Cirello, V., Cavaliere, A., Faviana, P., Mannavola, D., Moretti, S., Rossi, S., Sculli, M., Bottici, V., Beck-Peccoz, P., Pacini, F., Pinchera, A., Santeusano, F., and Elisei, R. (2006). Correlation between BRAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocrine-Related Cancer*, 13(2), 455-464.
154. Shi, C., Cao, J., Shi, T., Liang, M., Ding, C., Lv, Y., Zhang, W., Li, C., Gao, W., Wu, G., and Man, J. (2020). BRAF V600E mutation, BRAF-activated long non-coding RNA and miR-9 expression in papillary thyroid carcinoma, and their association with clinicopathological features. *World Journal of Surgical Oncology*, 18, 145.
155. Cohen, Y., Rosenbaum, E., Clark, D. P., Zeiger, M. A., Umbricht, C. B., Tufano, R. P., Sidransky, D., and Westra, W. H. (2004). Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clinical Cancer Research*, 10(8), 2761-2765.
156. Xu, X., Quiros, R. M., Gattuso, P., Ain, K. B., and Prinz, R. A. (2003). High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Research*, 63(15), 4561-4567.
157. Trovisco, V., Soares, P., and Sobrinho-Simões, M. (2006). B-Raf mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Human Pathology*, 37(7), 781-786.
158. Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., Duh, Q. Y., Shibru, D., Bastian, B., and Griffin, A. (2007). The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of Surgery*, 246(3), 466-471.
159. Nikiforova, M. N., Kimura, E. T., Gandhi, M., Biddinger, P. W., Knauf, J. A., Basolo, F., Zhu, Z., Giannini, R., Salvatore, G., Fusco, A., Santoro, M., Fagin, J. A., and Nikiforov, Y. E. (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(11), 5399-5404.

160. Trovisco, V., Vieira de Castro, I., Soares, P., Máximo, V., Silva, P., Magalhaes, J., Abrosimov, A., Guiu, X. M., and Sobrinho-Simões, M. (2004). BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 202(2), 247-251.
161. Silver, J. A., Bogatchenko, M., Pusztaszeri, M., Forest, V. I., Hier, M. P., Yang, J. W., Tamilia, M., and Payne, R. J. (2021). BRAF V600E mutation is associated with aggressive features in papillary thyroid carcinomas ≤ 1.5 cm. *Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 50(1), 63.
162. Al-Masri, M., Al-Shobaki, T., Al-Najjar, H., Iskanderian, R., Younis, E., Abdallah, N., Tbakhi, A., Haddad, H., Al-Masri, M., Obeid, Z., and Jarrar, A. (2021). BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: its relation to clinical features and oncologic outcomes in a single cancer centre experience. *Endocrine Connections*, 10(12), 1531-1537.
163. Ye, Z., Xia, X., Xu, P., Liu, W., Wang, S., Fan, Y., and Guo, M. (2022). The prognostic implication of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer in a Chinese population. *International Journal of Endocrinology*, 2022(1), 6562149.
164. Nechifor-Boilă, A., Zahan, A., Bănescu, C., Moldovan, V., Piciu, D., Voidăzan, S., and Borda, A. (2023). Impact of BRAF V600E mutation on event-free survival in patients with papillary thyroid carcinoma: A retrospective study in a romanian population. *Cancers*, 15(16), 4053.
165. Blazekovic, I., Samija, I., Perisa, J., Gall Troselj, K., Regovic Dzombeta, T., Radulovic, P., Romic, M., Granic, R., Markos, I. S., Frobe, A., Kusic, Z., and Jukic, T. (2024). Association of BRAF V600E Mutant Allele Proportion with the dissemination stage of papillary thyroid cancer. *Biomedicines*, 12(3), 477.
166. Birben, E. (2006). Polimeraz zincir reaksiyonu. *Astım Allerji İmmünoloji*, 4(2), 92-94.
167. Erol, İ., Yurtyeri, A., Hildebrant, G., ve Kleer, J. (1990). Polimeraz zincir reaksiyonu. Ankara: Ankara Üniversitesi, 29-39.
168. Morris, T., Robertson, B., and Gallagher, M. (1996). Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2933-2936.
169. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
170. Grove, D. (1999). Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 sequence detector. *Journal of Biomolecular Techniques*, 10(1), 11.
171. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöbak, R., Sjogreen, J., Strombom, L., Stahlberg, A., and Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.





Gazili olmak ayrıcalıktır