

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÜKLEER TIP ANABİLİM DALI



**TİROİD NODÜLLERİNİN MALİGN BENİGN AYRIMINDA
SİNTİGRAFİK ÖZELLİKLERİN VE LİKİD BİYOPSİ BULGULARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fulya KOÇ ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

Çanakkale 2022

ÇOMÜ-BAP Proje No: TTU-2020-3369

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÜKLEER TIP ANABİLİM DALI

TİROİD NODÜLLERİNİN MALİGN BENİGN AYRIMINDA
SİNTİGRAFİK ÖZELLİKLERİN VE LİKİD BİYOPSİ BULGULARININ
KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Fulya KOÇ ÖZTÜRK

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Semra ÖZDEMİR

Çanakkale 2022

ÇOMÜ-BAP Proje No: TTU-2020-3369

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden beri emeğini, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, özverisine hayran kaldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, hekim, yönetici ve eğitimci vasıflarının yanında hayata bakışı, dik duruşu, anneliği ile de hayatımda rol model olan kıymetli hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Semra ÖZDEMİR'e; akademik katkı, öneri ve yardımlarıyla gelişimime katkıda bulunan, bilgisi ve babacan tavrı ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren saygıdeğer hocam Dr.Öğr.Üyesi Yavuz Sami SALİHOĞLU'na emeklerinden dolayı saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tezin hazırlanmasında yardımını, bilgisini ve sabrını esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi Ersen KARAKILIÇ'a ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. Fatma SILAN ve Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dostluğu ile çalışma hayatımı renklendiren ve çalışma motivasyonumu yükselten sevgili asistan arkadaşım Dr. Büşra Aydur PÜREN'e, aile ortamı oluşturan, dostluklarını esirgemeyen, özveri ile çalışan hemşiremiz Aylin ERKAN'a, teknisyenlerimiz Semih YÜKSEL, Burcu ÖZEL'e ve sekreterimiz Tülay ŞAHİN'e sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezime büyük katkıları bulunan Elif ARI başta olmak üzere tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı personeline anlayışlarından, destek ve paylaşımlarından dolayı teşekkür ederim.

Evlatları olmaktan şeref duyduğum, sabırlarına ve özverilerine her zaman hayran olduğum, canım annem ve babama, moral ve neşe kaynağım olan dünyalar güzeli canım kardeşime, sevgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşime, hayatımı anlamlandıran sevgi dolu bir tanecik oğluma en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada amacımız, Tc-99m MİBİ sintigrafisi ile kanda lökositte, plazma free cell DNA (cfDNA)'da ve biyopsi hücrelerinde telomer uzunluğu ölçümlerinin tiroid malign lezyonlarının tanısında noninvaziv yöntemler olarak gücünü ve yerini araştırmaktır.

Metod: Malign tiroid nodülü ön tanısıyla ultrason ve Tc-99m MİBİ sintigrafi görüntülemesi ve iğne biyopsisi yapılan 128 hastanın verileri analiz edildi. Bu hastaların 98'inde, kandan elde edilen lökositlerde, plazmadan elde edilen cfDNA' larda ve biyopsi materyalinden elde edilen hücrelerde Q PCR yöntemiyle telomer uzunluğu ölçüldü. Telomer uzunluğu Telomer/Singlecopy (T/S) oranını veren bir formül ile hesaplandı; T/S değeri referans DNA' ya göre normalize edilerek rölatif T/S oranı hesaplandı. Sitolojik inceleme sonuçlarına göre hastalar malign, benign ve şüpheli olarak üç gruba ayrıldı. Grupların ortalamaları arasındaki farklılık Kruskal Wallis ve Ki kare yöntemiyle, değişkenler arasındaki bağımlılık Spearman korelasyon analizi ile incelendi.

Bulgular: Malign tiroid nodüllerinin tanısı için Tc-99m MİBİ sintigrafisinin sensitivitesi, spesifitesi, pozitif prediktif değeri, negatif prediktif değeri ve doğruluğu sırasıyla %64,70, %79,16, %29,72, %83,51 ve %67,96 bulundu. Elde edilen sonuçlar genel olarak literatürde bildirilenlerle benzer iken, pozitif prediktif değer daha düşük bulundu. Lökosit, plazma ve doku telomer uzunlukları (T/S değerleri) gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi. Grupların tamamında telomer uzunlukları tam kan, plazma ve doku olarak sıralanmaktaydı.

Sonuç: Tiroid nodüllerinde malignite tanısı için Tc-99m MİBİ sintigrafi makul tanısal doğruluk değerlerine sahip gözükmemektedir. Sınırlı sayıda olan literatür bulgularının aksine fragmente telomerik uzunluklarının tiroid malignitesinin öngörülmesinde geçerli bir metod olamayabileceği düşünüldü. Daha geniş hasta serilerinin dahil edildiği kapsamlı araştırmaların yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tiroid kanseri, Tc-99m MİBİ Sintigrafisi, cfDNA, Likit biyopsi, ctDNA, Telomer



ABSTRACT

Objective: Our aim in this study is to investigate the power and place of Tc-99m MIBI scintigraphy and telomere length measurements in blood leukocytes, plasma free cell DNA (cfDNA) and biopsy cells as noninvasive methods in the diagnosis of thyroid malignant lesions.

Methods: The data of 128 patients who underwent ultrasound, Tc-99m MIBI scintigraphy imaging and needle biopsy with the preliminary diagnosis of malignant thyroid nodule were analyzed. In 98 patients, telomere length was measured in leukocytes obtained from blood, cfDNA obtained from plasma and cells obtained from biopsy material by Q PCR method. Telomere length was calculated with a formula giving the Telomer/Singlecopy (T/S) ratio; the relative T/S ratio was calculated by normalizing the T/S value to the reference DNA. According to the results of cytological examination, patients were divided into three groups as malignant, benign and suspicious. The difference between the means of the groups was analyzed with the Kruskal Wallis and Chi-square method, and the dependence between the variables was analyzed with the Spearman correlation analysis.

Results: The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of Tc-99m MIBI scintigraphy for the diagnosis of malignant thyroid nodules were found 64.70%, 79.16%, 29.72%, 83.51% and 67.96%, respectively. While the results obtained were generally similar to those reported in the literature, the positive predictive value was found to be lower. Leukocyte, plasma and tissue telomere lengths (T/S values) did not differ significantly between the groups. Telomere lengths were listed as whole blood, plasma and tissue in all groups.

Conclusion: Tc-99m MIBI scintigraphy seems to have reasonable diagnostic accuracy for the diagnosis of malignancy in thyroid nodules. Contrary to the limited number of literature findings, it was thought that fragmented telomeric lengths may

not be a valid method for the prediction of thyroid malignancy. It would be useful to conduct comprehensive studies involving larger patient series.

Keywords: Thyroid cancer, Tc-99m MIBI Scintigraphy, cfDNA, Liquid biopsy, ctDNA, Telomere



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar.....	xiv
GRAFİKLER.....	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	10
2. GENEL BİLGİLER.....	12
2.1. Tiroid Bezinin Embriyolojisi	12
2.2. Tiroidin Anatomisi	12
2.2.1. Tiroidin Damarları Ve Lenfatik Sistemi.....	13
2.2.2. Tiroidin İnnervasyonu	14
2.3. Tiroidin Fizyolojisi ve Tiroid hormonları	14
2.4. Tiroid Nodüllerinin Patogenezi	19
2.5. Tiroid Neoplazilerinin Moleküler Genetiği.....	20
2.6. Tiroid Neoplazmalarının Histolojik Sınıflandırması	26
2.6.1. Folliküler Adenom ve Borderline Tümörler.....	28
2.6.2. Hyalinize Trabeküler Tümör.....	30
2.6.3. Papiller Tiroid Karsinomu.....	31
2.6.4. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK)	35
2.6.4.1. Foliküler Tiroid Karsinomu Varyantları.....	35
2.6.5. Hurtle (Onkositik) Hücreli Tümörler.....	36
2.6.6. Az Diferansiye Tiroid Karsinomu	36
2.6.7. Anaplastik Tiroid Karsinom	36
2.6.8. Skuamöz Hücreli Karsinom	37
2.6.9. Meduller Tiroid Karsinomu	37

2.6.10. Mikst Meduller ve Follikuler Tiroid Karsinomu	37
2.6.11. Mukopeidermoid Karsinom	37
2.6.12. Müsinöz Karsinom	37
2.6.13. İntratiroidik Timik Karsinom	38
2.7. Tiroid Nodüllerine Tanısal Yaklaşım	38
2.7.1. Anamnez ve Fizik Muayene.....	38
2.7.2. Görüntüleme	39
2.7.2.1. Ultrasonografik Görüntüleme.....	39
2.7.2.2. Radyonüklid Görüntüleme	42
2.7.2.2.1. Tiroid Sintigrafisinde Kullanılan Radyofarmasotikler	43
2.7.2.2.2. Tiroid Sintigrafisinin Değerlendirilmesi	45
2.7.2.3. Tc-99m MİBİ Sintigrafisi	46
2.7.2.3. Diğer Görüntülemeler	48
2.7.3. Tiroid Sitopatolojisi	48
2.8. Cell Free DNA.....	50
2.8.1. cfDNA'nın Kullanıldığı Alanlar.....	53
2.9. Likit Biyopsi	54
2.10. Telomer, Telomeraz ve Kanser.....	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Etik izin	61
3.2. Örneklem Seçimi ve Çalışmaya Alım Ölçütleri.....	61
3.3. Hasta Gruplarının Oluşturulması.....	61
3.4. Tc-99m MİBİ Sintigrafisi.....	62
3.5. Biyopsi	62
3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayrıştırılması.....	63
3.6.1. DNA İzolasyonu.....	64
3.6.2. Q-PCR Yöntemi ile Telomer Uzunluğu Ölçümü.....	65
3.6.2.1. Standartların Hazırlanması.....	65
3.6.2.2. Numunelerin Telomer ve Beta globulin PCR çalışmasına alınması	65
3.6.2.2.3. Kantitatif Telomer Uzunluğu Değerlendirilmesi	66
3.7. İstatistiksel analiz.....	67
4. BULGULAR.....	68
4.1. Tanımlayıcı Bulgular	68

4.2. Tiroid Nodüllerinin Ultrasonografik Özelliklerinin Karşılaştırılması	68
4.3. Tc-99m MİBİ Sintigrafi Sonuçlarının Karşılaştırılması	69
4.4. DNA izolasyon sonuçları.....	73
4.5. Kantitatif Telomer Uzunluğu Ölçümü Sonuçları	73
4.6. Kan, Plazma ve Doku Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması	74
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ	87
7. KAYNAKLAR.....	88



KISALTMALAR ve SİMGELER

ACR	American College of Radiology
ALT	Telomerlerin alternatif uzaması
ATA	Amerikan Tiroid Birliği
AUS	Önemi belirsiz atipi
BIRADS	Breast Imaging reporting and Data System
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cfDNA	Cell free DNA
CTCs	Dolaşımdaki tümör hücreleri
ctDNA	Dolaşımdaki tümör DNA'sı
DAG	1,2-diaçilgliserole
DIO1	Deiyodinaz tip I
DIO2	Deiyodinaz tip II
DIO3	Deiyodinaz tip III
DIT	Diiyodotirozin
EBV	Epstein-Barr virüs
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikası
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
ETS	E-twenty-six
EVs	Hücre dışı veziküller
FA	Foliküler adenom
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FK	Foliküler karsinom
FLUS	Önemi belirsiz foliküler lezyon
FN	Foliküler neoplazm
FTK	Foliküler tiroid kanseri
FT-UMP	Belirsiz malign potansiyele sahip foliküler tümör
FVPTK	Foliküler varyant papiller tiroid kanseri
GABPA	GA Bağlayıcı Protein Transkripsiyon Faktörü Alt Birimi Alfa
HA	Hurtle hücreli adenom
HBV	Hepatit B virüs
HCC	Hepatoselüler karsinom
HK	Hurtle hücreli karsinom
HPV	İnsan papilloma virüsü
IP	İnositol 1,4,5-trifosfat
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadı
MİBİ	Methoxyisobutylisonitrile
MIT	Monoiyodotirozin

MRP1	Multidrug resistance-associated protein-1
NEPRAS	Noninvaziv kapsüllü papiller RAS-benzeri tiroid tümörü İnvaziv olmayan papiller benzeri nükleer özelliklerle sahip foliküler tiroid neoplazmı
NIFTP	Noninvaziv prenatal test
NIPT	Negatif prediktif değer
NPD	Fosfatidilinositol 4,5-P
PIP	cAMP'ye bağımlı protein kinaz
PKA	Fosfolipaz C
PLC	Pozitif prediktif değer
PPD	Papiller tiroid kanseri
PTK	Renal hücreli kanser
RCC	Reverse T3
rT3	Skuamoz hücreli karsinom
SCC	Singlecopy gene
S	Telomer
T	Triiyodotironin
T3	Tetraiyodotironin
T4	Tiroksin bağlayıcı globulin
TBG	The cancer genome atlas research network
TCGA	telomeraz reverse transkriptaz
TERT	Thyroid Imaging Reporting and Data System
TIRADS	Tiroid ince iğne aspirasyon biyopsisi
TİİAB	Tirotropin salgılatıcı hormon
TRH	Tiroid uyarıcı hormon
TSH	Ultrason
USG	Başka türlü tanımlanmamış iyi diferansiye karsinom
WDC-NOS	İyi diferansiye belirsiz malign potansiyelli tümör
WDT-UMP	Dünya Sağlık Örgütü
WHO	

ŞEKİLLER

Şekil 1. Tiroid ve paratiroid bezlerinin anatomisi (13)	13
Şekil 2. Tiroid bezinin vasküler anatomisi (19)	14
Şekil 3: Tiroid bezinde iyodür taşınmasının şematik gösterimi (28)	17
Şekil 4. Tiroid hormon sentezi ve salınımı (31).....	17
Şekil 5. Tiroid neoplazmlarının histolojik sınıflandırmasının zaman içerisinde değişimi	28
Şekil 6. Kapsüllü foliküler patern tiroid tümörlerinin şematik açıklaması	29
Şekil 7. Kapsüllü papiller patern tiroid tümörlerinin şematik açıklaması	29
Şekil 8. Kapsüllü papiller tiroid karsinomu dahil olmak üzere dört farklı noninvaziv kapsüllü tiroid tümörünün nasıl sınıflandırılacağına şematik açıklaması	30
Şekil 13 Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi hasta örnekleri	72
Şekil 14. Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi primer tiroid lenfoması hasta örneği.....	72
Şekil 9: Telomerik Tekrar Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri	73
Şekil 10: Betaglobulin Gen Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri.....	74
Şekil 12: Betaglobulin Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü	74

TABLolar

Tablo 1. Tiroid kanserinde genetik mutasyonların prevalansları.....	24
Tablo 2. WHO (2017) Tiroid Kanser Sınıflaması	27
Tablo 3. Papiller tiroid kanseri varyantlarının tanısında histolojik kriterler	31
Tablo 4. Tiroid görüntülemeye kullanılan diğer radyofarmasotikler	44
Tablo 5. Bethesda sistemine göre malignite risk yüzdeleri ve önerilen tedavi takip planı.....	50
Tablo 6. PCR çalışması hazırlığı	65
Tablo 7. Telomer kantitasyon protokolü.....	66
Tablo 8. Betaglobulin Kantitasyon Protokolü	66
Tablo 9. Çalışma grubu hastalarının demografik ve klinik özellikleri	70
Tablo 10. Bethesda sınıflamasına göre tiroid biyopsi sonuçları.....	71
Tablo 11. Malign gruptaki hastaların tiroid biyopsi sonuçlarının histopatolojik tipleri	71
Tablo 12. Tc-99m MİBİ sintigrafisinin malign-benign nodül saptamadaki sensitivite, spesifite, pozitif prediktif ve negatif prediktif değer oranları	71
Tablo 13. cfDNA telomer uzunluğu değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması	75
Tablo 14. Tüm gruplardaki telomer uzunluklarının ikili karşılaştırılması	76

GRAFİKLER

- Grafik 1.** Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p=0.668$) tam kan rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği..... 76
- Grafik 2.** Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p= 0.472$) plazma rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği..... 77
- Grafik 3.** Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p=0.396$) tiroid biyopsi dokusu rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği. 77
- Grafik 4.** Tam kan rölatif T/S ratio ROC Curve analiz sonucu..... 78
- Grafik 5.** Plazma rölatif T/S ratio ROC Curve analiz sonucu..... 79
- Grafik 6.** Tiroid biyopsi doku rölatif T/S ratio ROC Curve analiz sonucu..... 79

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tiroid nodülleri toplumda oldukça yaygın görülmektedir. Erişkinlerin %4-8'inde palpe edilebilen nodüller bulunurken ultrason taraması ile nodüler hastalık prevalansı %68'e kadar çıkar, otopsi olgularında ise %50 oranında bildirilmektedir. Saptanan tiroid nodüllerinin fonksiyonel durumu ve malign olup olmadıklarının aydınlatılması son derece önemlidir. Bu amaçla hastaların tiroid fonksiyon testleri, USG (ultrason) bulguları ve sintigrafik bulguları araştırılmaktadır. Tiroid fonksiyon testleri genel anlamda tiroid bezinin ve nodüllerin fonksiyonel durumları hakkında bilgi verse de malignite varlığı hakkında herhangi bir ipucu verememektedir. Yine saptanan bir nodülün USG özellikleri malignite hakkında şüphe uyandırsa da hiçbir US bulgusu maligniteyi göstermede hem duyarlı hem de özgül değildir. Tiroid ultrasonografisi ile tiroid nodüllerinin boyut, yapı, ekojenite, kalsifikasyon, halo varlığı, kenar düzeni ve kan akımı özelliklerine bakılarak malign-benign nodül ayırımı yapılmaya çalışılmaktadır.

Tiroid nodüllerinin malignite potansiyelini belirlemek için yapılan tetkiklerden biri de tiroid sintigrafisidir. Tc-99m MİBİ (Methoxyisobutylisonitrile) ile yapılan tiroid sintigrafisinde tutulum oranları ve washout (atılım) düzeyleri nodüllerde malignite varlığı açısından yol gösterici olabilmektedir.

Son yıllarda telomerik DNA boyutunun ve disfonksiyonunun sayısal, yapısal kromozom instabilitesini tetiklediği ve tümörögenizde önemli bir etyolojik parametre olduğu bilinmektedir. Serum ve plazmada saptanabilen cfDNA (Cell free DNA) ölçümleri; tümöre spesifik moleküler değişikliklerin belirlenmesinde, kanserin erken ve güvenilir tanısında ve böylece erken müdahale ve korunma stratejileri geliştirilmesinde, risk altında bulunanların belirlenmesinde, ayrıca prognoz tahmininde ve tümör yüküne bağlı olarak tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde, önemi gittikçe artan ve değerlendirilmesi gereken bir potansiyele sahiptir. Tiroid dokusundan yapılan klasik ince iğne aspirasyon biyopsilerin tümör dokusunun belirli kısmı hakkında bilgi verebildiğini ayrıca önemi belirsiz atipi veya yetersiz materyal gibi şüpheli histolojik sonuçlar verebilmektedir.

Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızda non invaziv metodlar olan Tc-99m MİBİ sintigrafisinin ve likit biyopsi metodlarından biri olan telomer uzunluk ölçümlerinin tiroid malign lezyonlarının tanısındaki gücünü ve yerini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

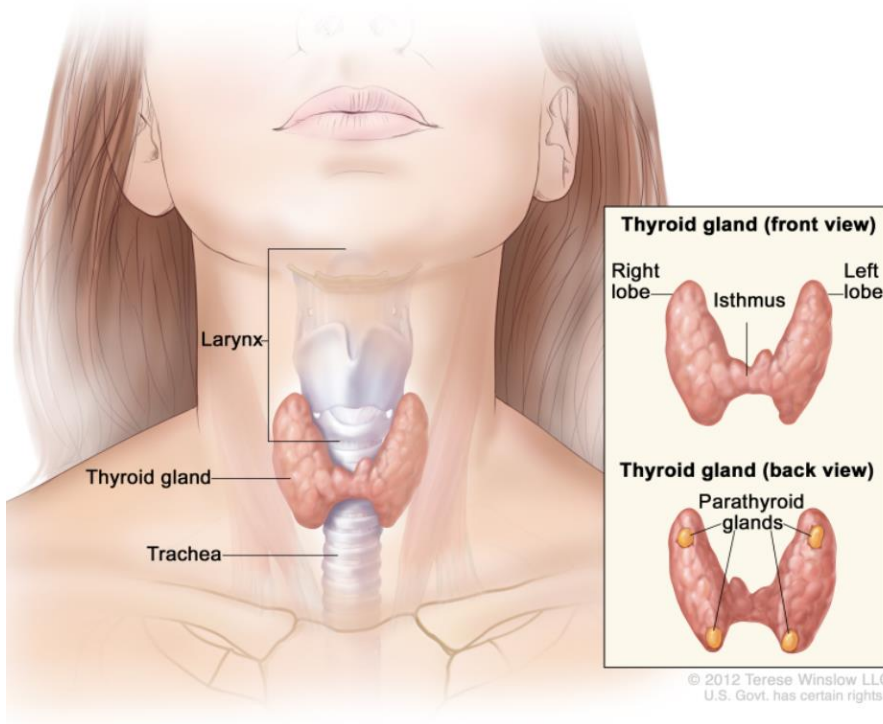
2.1. Tiroid Bezinin Embriyolojisi

Tiroid bezi embriyoda ilk gelişen endokrin bezdir. Primitif barsak kökenlidir ve embriyolojik hayatın dördüncü haftasında orta endodermal divertikül olarak ortaya çıkar. Tiroid iki ana yapıdan orijin alır: primitif farinks ve nöral krest. Rudimenter lateral tiroid, nöral krest hücrelerinden gelişirken, bezin büyük kısmını oluşturan medyan tiroid primitif farinksten köken alır. Tiroid aşağı doğru inerken 4. ve 5. faringeal poşların ultimobrankial cisimlerinden köken alan lateral komponentler beze katılır. Bu lateral komponentler tiroidin kalsitonin salgılayan C hücrelerini oluşturur. Parafoliküler C hücreleri endoderm kökenli olmayıp ektodermden köken alır. Tiroid folikülleri sekizinci haftada ortaya çıkar ve kolloid formasyonu on birinci haftada oluşur. İntrauterin üçüncü ayda tiroid bezi iyot tutmaya ve tiroid hormonu salgılamaya başlar (1,2,3,4).

2.2. Tiroidin Anatomisi

Tiroid bezi insan vücudundaki en büyük endokrin bezdir. Tiroid bezi, tiroid kartilajın alt yarısından, krikoid kartilaj ve 5. veya 6. trakeal halkaya kadar uzanır (şekil 1). Farinks, larinks, özofagus ve trakeanın anterior ve lateral yüzeylerini sarar. Tiroid bezi normalde komşu organlardan rahatlıkla ayrılabilir durumdadır fakat posterior süspansuar ligament (Berry ligamenti) aracılığı ile krikoid kıkırdak ve üst trakeal halkalara sıkıca yapışıktır. Tiroid bezi sağ ve sol olmak üzere iki lob ve bu lobları ortada birleştiren istmustan oluşmaktadır. Ayrıca %50-80 olguda istmustan yukarıya doğru uzanan, tiroglossal kanalın kalıntısı olan piramidal lob bulunmaktadır, piramidal lob genellikle orta hattın biraz daha solunda yer almaktadır. Yetişkinlerde ortalama ağırlığı 15-20 gr, iyot eksikliği olmayan sağlıklı yetişkinlerde boyutları yaklaşık 4 -4,8 x 1- 1,8 x 0,8-1,6 cm ve sonografide ortalama hacmi 7 ila 10 mL'dir (5-12).

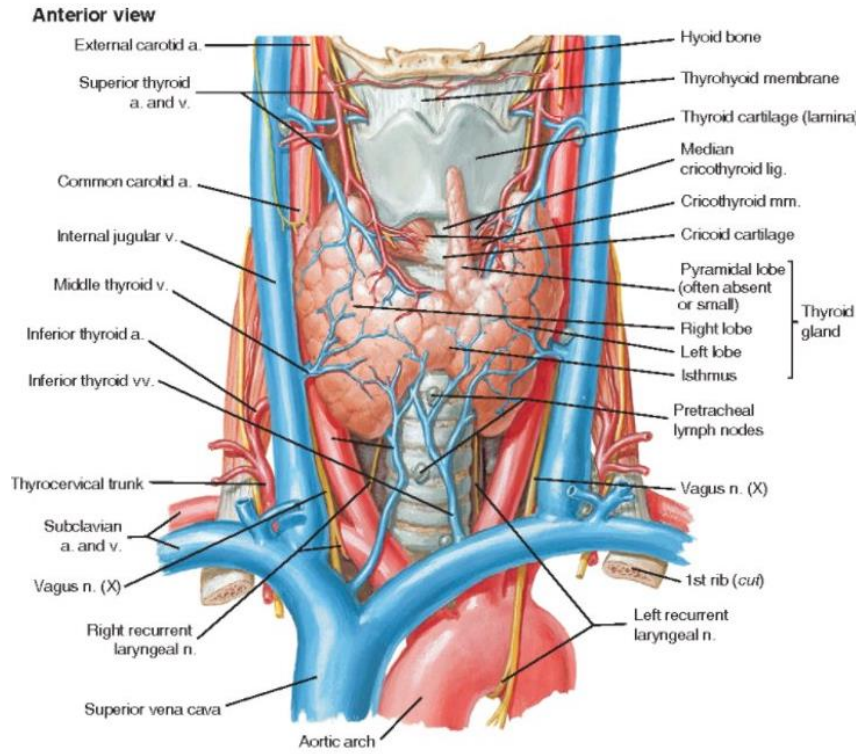
Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands



Şekil 1. Tiroid ve paratiroid bezlerinin anatomisi (13)

2.2.1. Tiroidin Damarları Ve Lenfatik Sistemi

Boyutları düşünüldüğünde, tiroid bezi vücuttaki kanlanması en zengin organlardan biridir. Tiroid bezi superior ve inferior tiroid arterler ile kanlanır. Superior tiroidal arter, eksternal karotis arterin ilk dalıdır ve karotis arterin bifurkasyon düzeyinden ayrılır. Tiroide üst polün apeksinden girer ve üst polü besler. İnfierior tiroid arter ise tiroidin ana kan desteğini sağlayan arteridir. İnfierior tiroid arter subklavian arterin tiroservikal trunkusundan kaynaklanır. İnfierior tiroid arter ana karotis arterin arkasından seyrederek tiroid bezinin medial kısmına paralel olarak dallanarak girer. Nadir olarak brakiosefalik trunkustan çıkıp, tiroide giren 'arteria thyroidea ima' bulunabilir. Bu arter sıklıkla brakiosefalik trunkustan çıkar fakat arkus aorta ve sol common karotis arterden de kaynaklanabilir. Tiroidea ima arteri doğrudan tiroide girer ve isthmusu besler. Venöz drenaj, tiroid bezi çevresinde venöz pleksus oluşturan üst, orta ve alt tiroid venleri tarafından sağlanır. Üst ve orta venler internal juguler vene, alt venler ise brakiyosefalik vene drene olur (şekil 2) (14-18).



Şekil 2. Tiroid bezinin vasküler anatomisi (19)

Tiroid bezinin lenfatik drenajı alt derin servikal, prelaringeal, pretrakeal ve paratrakeal lenf nodlarını içerir. Paratrakeal ve alt derin servikal lenf nodları, isthmus ve alt lateral loblardan lenfatik drenaj sağlar. Tiroid bezinin üst kısımları, üst pretrakeal ve servikal lenf nodlarına drene olur (20).

2.2.2. Tiroidin İnnervasyonu

Bezin innervasyonu otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik lifleri tarafından sağlanır. Sempatik innervasyonu üst ve orta servikal sempatik gangliyonlardan çıkan liflerden; parasempatik innervasyonu ise nervus vagus'tan çıkan kardiak ve laringeal lifler tarafından sağlanır (21).

2.3. Tiroidin Fizyolojisi ve Tiroid hormonları

Triiyodotironin (T3) ve tetrayodotironin (T4, tiroksin) tiroid bezi tarafından üretilen ana hormonlardır. Tiroid hormonu salınımı hipotalamus-hipofiz-tiroid aksı

adı verilen kendi kendini düzenleyen bir sistem tarafından sağlanır. Hipotalamustan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), ön hipofiz bezinden tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve tiroidden salınan T4 feed back mekanizmasını ve homeostazı korumak için senkronize bir şekilde çalışır. Tiroid bezi tarafından salgılanan tiroid hormonu metabolizmayı, büyümeyi ve diğer birçok vücut fonksiyonunu kontrol etmektedir. Hipotiroidizm, tipik olarak bradikardi, soğuk intoleransı, kabızlık, yorgunluk ve kilo artışına neden olurken; hipertiroidizm, kilo kaybı, ısı intoleransı, ishal, titreme ve kas güçsüzlüğü olarak kendini gösterir (22, 23).

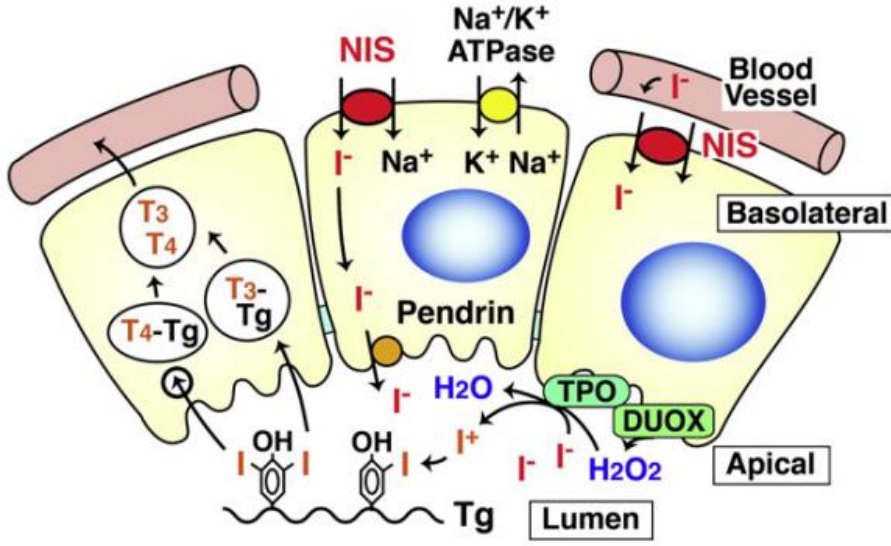
Tiroid hormonların ayrılmaz bir parçası olan iyot elementi besinler vasıtasıyla alınır ve ince bağırsaktan emilir. İyot kaynakları arasında iyotlu sofrata tuzu, deniz ürünleri, deniz yosunu ve sebzeler bulunur. İyot alımının azalması, iyot eksikliğine ve tiroid hormon sentezinin azalmasına sebep olabilir. İyot eksikliği kretinizm, guatr, miksödem koması ve hipotiroidizme neden olabilir (23, 24, 25).

Tiroid hormonunun düzenlenmesi hipotalamusta başlar. TRH, hipotalamusun periventriküler çekirdeğindeki hücre gövdelerinde üretilen hipotalamo-hipofizer portal sisteme salgılanan bir peptid hormonudur. TRH, ön hipofizdeki tirotropin hücrelerini TSH salınması için uyarır. Ön hipofiz bezindeki TRH reseptörlerine bağlanarak G-proteinine bağlı bir reseptörün aracılık ettiği bir sinyal zincirini aktive eder. Gq proteininin aktivasyonu, fosfoinositide özgü fosfolipaz C'nin (PLC) aktivasyonuna yol açar. PLC, fosfatidilinositol 4,5-P (PIP)'yi inositol 1,4,5-trifosfat (IP) ve 1,2-diaçilgliserole (DAG) hidrolize eder. Bu ikinci haberciler, hücre içi kalsiyum depolarını harekete geçirir ve protein kinaz C'yi aktive ederek TSH'nin transkripsiyonunu başlatırlar. TRH esas olarak tropik bir hormondur, yani endokrin bezleri uyararak etki gösterir. Bununla birlikte hipotalamik-hipofiz-prolaktin eksenini yoluyla ön hipofizdeki laktotropik hücreleri prolaktin üretmek için doğrudan uyarır; yani tropik olmayan bir etkiye de sahiptir (26).

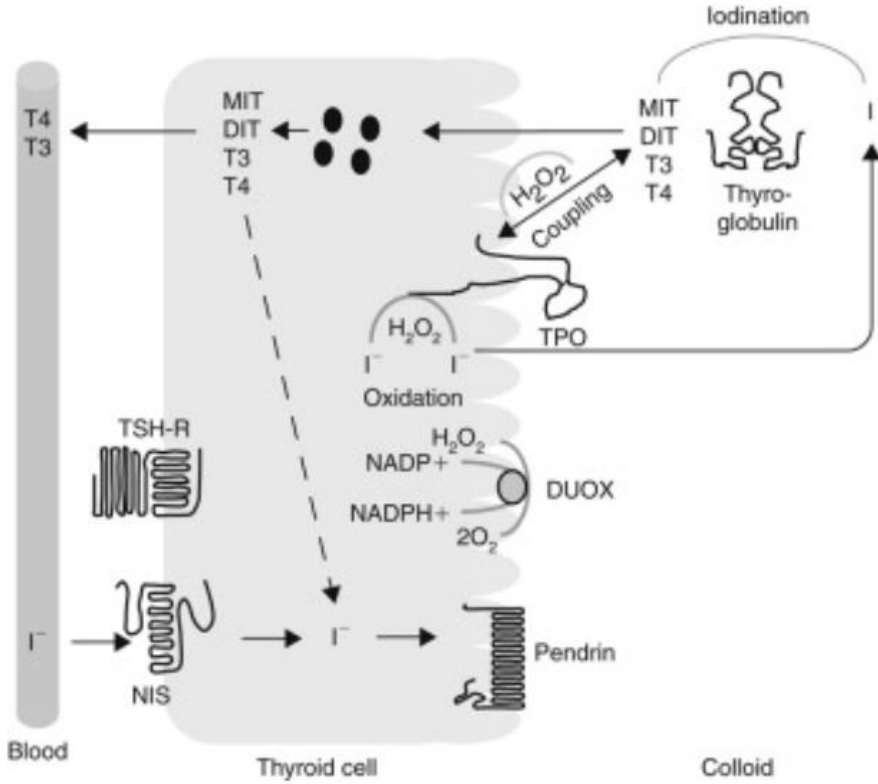
TSH kana salındığında tiroid foliküler hücrelerinin bazolateral yüzündeki tiroid salgılatıcı hormon reseptörüne bağlanır. Tiroid salgılatıcı hormon reseptörü, Gs-

proteinine bağılı bir reseptördür ve aktivasyonu, adenilil siklazın aktivasyonuna ve hücre içi cAMP seviyelerinde artışa yol açar. Artan cAMP, protein kinaz A'yı aktive eder. Protein kinaz A, işlevlerini değiştirmek amacıyla farklı proteinleri fosforile eder (27). Tiroid hormon üretimi ve salgılanması beş adımda gerçekleşir:

1. Tiroglobulin Sentezi: Tiroid foliküllerindeki tiroositler tarafından üretilen tiroglobulin öncül bir proteindir. Tiroositlerin endoplazmik retikulumda üretilir, golgi aygıtında veziküllerde paketlenir ve daha sonra ekzositoz yoluyla folikül lümenine gönderilir ve burada depolanır.
2. İyodür alımı: Protein kinaz A fosforilasyonu ile aktive olan Na⁺/K⁺ ATPaz sodyum iyodür simporter (NIS) aktivasyonuna yol açar. NIS yoluyla dolaşımdan tiroosit içine alınan iyodür, pendrin taşıyıcı vasıtasıyla folikül lümenine geçer (Şekil 3).
3. Tiroglobulinin iyodinasyonu: Protein kinaz A tiroid peroksidaz enzimini fosforile ederek aktive eder. Tiroid peroksidazın üç işlevi vardır:
 - a) Oksidasyon: Tiroid peroksidaz, apikal bir enzim olan NADPH-oksidad tarafından üretilen hidrojen peroksiti kullanarak oksidasyon yoluyla iyodidi (I-) iyodine (I₂) dönüştürür.
 - b) Organifikasyon: Tiroid peroksidaz, tiroglobulindeki tirozinleri iyodin ile bağlayarak iyotlu tek bir tirozin kalıntısına sahip monoiyodotirozin (MIT) ve iyotlu iki tirozin kalıntısına sahip diiyodotirozin (DIT) üretir.
 - c) Coupling reaksiyonu: Tiroid peroksidaz, tiroid hormonları yapmak için iyotlu tirozin kalıntılarını birleştirir. MIT ve DIT birleşerek T₃'ü oluşturur ve iki DIT molekülü birleşerek T₄'ü oluşturur.
4. Depolama: Tiroid hormonları, tiroglobuline bağlanarak foliküler lümeninde depolanır.
5. Salınım: Tiroid hormonları, Şekil 4'te gösterilen adımlarla tiroositler tarafından fenestre kılcıl damar ağına salınır: 1) Tiroositler, endositoz yoluyla iyotlu tiroglobulini alır, 2) Lizozom, iyotlu tiroglobulin içeren endozom ile kaynaşır, 3) Endolizozomdaki proteolitik enzimler, tiroglobulini MIT, DIT, T₃ ve T₄'e ayırır, 4) T₃ (%20) ve T₄ (%80) fenestre kapillerlere salınır, 5) Deiyodinaz enzimleri, iyot moleküllerini DIT ve MIT'den uzaklaştırır. İyot hücre içi iyodür havuzuna yeniden dağıtılır (29, 30).



Şekil 3: Tiroid bezinde iyodür taşınmasının şematik gösterimi (28)



Şekil 4. Tiroid hormon sentezi ve salınımı (31)

Genel olarak, tiroid hormonu intranükleer reseptörüne bağlandığında, metabolizma ve termogenezi artıran genleri aktive eder. Artan metabolik hız,

oksijen ve enerji tüketimini artırır. Tiroid hormonu, kalp, santral sinir sistemi, otonom sinir sistemi, kemik, gastrointestinal sistem ve metabolizma dahil olmak üzere vücuttaki hemen hemen her sistemini etkiler. Tiroid hormonlarının katekolaminler üzerinde kontrol edici etkisi vardır. Kalp atış hızını, atım hacmini, kalp debisini ve kontraktiletiyi artırmak için beta reseptörlerinin ekspresyonunu artırır. Tiroid hormonları solunum merkezlerini uyarır ve artan perfüzyon nedeniyle oksijenlenmenin artmasına neden olur. Tiroid hormonları, hızlı ve güçlü kasılmalar yapabilen hızlı kasılan kas lifleri olan tip II kas liflerinin gelişiminin artırır. Tiroid hormonu bazal metabolizma hızını artırır. Na⁺/K⁺ ATPaz'ın farklı dokularda gen ekspresyonunu artırarak oksijen tüketiminin, solunum hızının ve vücut sıcaklığının artmasına neden olur. Metabolik duruma bağlı olarak lipoliz veya lipid sentezini indükleyebilir. Tiroid hormonları, karbonhidratların metabolizmasını ve proteinlerin anabolizmasını uyarır. Fakat yüksek dozlarda proteinlerin katabolizmasını indükleyebilir. Tiroid hormonları kan glukoz seviyesini değiştirmezler, ancak artan glukoz reabsorpsiyonuna, glukoneogeneze, glikojen sentezine ve glukoz oksidasyonuna neden olabilirler. Çocuklarda tiroid hormonları, kemik büyümesini uyarmak için büyüme hormonu ile sinerjistik olarak hareket eder. Kondrositleri, osteoblastları ve osteoklastları indükler. Tiroid hormonu ayrıca aksonal büyüme ve miyelin kılıfın oluşumu ile beynin olgunlaşmasına yardımcı olur (32). Tiroid hormonları lipofiliktir ve dolaşımda proteinlere bağlı olarak dolaşır. Serbest T4'ün yalnızca %0.2'si bağlanmamış ve aktiftir. Taşıyıcı proteinler arasında tiroksin bağlayıcı globulin (TBG), transtiretin ve albümin bulunur. T4'ün büyük çoğunluğunu (üçte ikisini) TBG taşır. Hedef bölgesine ulaştığında, T3 ve T4, difüzyon veya taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla hücrelere girmek için bağlayıcı proteinlerinden ayrışır. Sonrasında T3 veya T4 ilgili dokudaki nükleer alfa veya beta reseptörlerine bağlanır ve belirli genlerin ve hücreye özgü yanıtların aktivasyonuna yol açan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olur. Tiroid hormonları karaciğerde glukuronidasyon yoluyla parçalanır ve safra ile atılır.

Tiroid reseptörleri hem T3 hem de T4'e bağlanabilen transkripsiyon faktörleridir. Ancak, T3 için çok daha yüksek bir afiniteye sahiptirler. Sonuç olarak, T4 nispeten aktif değildir. Deiyodinazlar, T4'ü aktif T3'e veya aktif olmayan reverse T3'e (rT3) dönüştürür. Üç tip deiyodinaz vardır: tip I, II ve III. Tip I (DIO1) ve II

(DIO2) karaciğer, böbrekler, kaslar ve tiroid bezlerinde bulunur. Tip III (DIO3) deiyodinazlar santral sinir sisteminde ve plasentada bulunur. DIO1 ve DIO2, T4'ü aktif form T3'e dönüştürür ve DIO3, T4'ü aktif olmayan form rT3'e dönüştürür (33).

2.4. Tiroid Nodüllerinin Patogenezi

Tiroid nodül oluşumu, genetik ve/veya epigenetik mekanizmalara bağlı olarak tiroid heterojenitesinin amplifikasyonu olarak düşünülebilir. Tiroid nodülleri histolojik özelliklerine göre beş tipe sınıflandırılabilir: hiperplastik, neoplastik, kolloid, kistik ve tiroiditik nodüller (34). Tiroid hücre proliferasyonu TSH'nin kontrolü altındadır, ancak tiroid hiperplazisinde foliküler hücreler, stromal komponent ve lenfositler tarafından salgılanan parakrin ve otokrin faktörler rol oynar. Hiperplazi esas olarak TSH reseptörü, cAMP ve PKA yoluyla gerçekleşir. TSH reseptörü veya Gs proteininin hiperfonksiyon üreten nokta mutasyonunun cAMP aşırı üretimine sebep olduğu (35). Tiroid malignitelerinde birkaç aktif onkogen tanımlanmıştır. Tiroid karsinogenezi ile ilgili onkogenler: mutasyona uğramış TSH reseptörü ve gsp (cAMP'nin yapısal aktivasyonu); TRK (NGF için reseptör); RET/PTK (tirozin kinaz reseptörünün fosforilasyonu), ve c-MET (hepatosit büyüme faktörü için reseptör). Diferansiye bir tiroid kanserinin andiferansiye bir kansere doğru evrimi, bir fren görevi gören ve kanserin genomik kararsızlığını önleyen p53 protein ailesinin mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Bir tümörün RET veya ras tarafından başlatıldığı ve muhtemelen ek mutasyonların ve p53 mutasyonunun bir sonucu olarak anaplastik karsinomaya ilerlediği ileri sürülmektedir (36). Konsantrasyon tiroglobulin çözeltisinden oluşan viskoz materyal içeren foliküllerin genişlemesi ve epitelin düzleşmesi kolloid nodülün özelliğidir. Tiroglobulin çözeltisinin intraluminal reabsorpsiyon kusuru öne sürülmüştür ancak kanıtlanmamıştır. Deneysel olarak, bir iyot yükü tiroid hiperplazisini kolloid bir özelliğe dönüştürebilir; bununla birlikte, hastaların klinik geçişinde nadiren bir iyot yükü bulunur. Tiroglobulinin globüllere depolanmasının kolloid nodüllerde kusurlu olduğu ve folikülün büyümesine yol açtığı ileri sürülmektedir (37). Tiroid nodüllerinin %15 ila %40'ının kısmen veya tamamen kistik olduğu tahmin edilmektedir. 'Gerçek kist' nadirdir; kistik nodüllerin çoğu nekroz ve likefaksiyonu takip eden 'psödokistler'dir. Nekroz, büyüme ile kesin

olarak düzenlenmiş anjiyogenez süreci arasında bir dengesizlik olarak ortaya çıkar. VEGF/VPF'nin yeni ve tekrarlayan kistlerin kaynağı olduğu bulunmuştur (38). İmmünotoksik ve apoptotik mekanizmalar da öne sürülmüştür. Nodüler lenfositik tiroidit iki farklı durumu içerir: 1) hiperplastik veya normal bir tiroid bezinde ortaya çıkan nodüler lenfositik tiroidit ve 2) lenfositik tiroidit zeminli tiroid bezinde ortaya çıkan nodüler hastalık. Papiller tiroid karsinomu ve lenfomanın kronik lenfositik tiroidit (Hashimoto) ile ilişkili olduğu bulunmuştur (39).

2.5. Tiroid Neoplazilerinin Moleküler Genetiği

Birçok neoplazide olduğu gibi tiroid karsinomlarında da aktive onkogenler altta yatan sebep olarak kabul edilmektedir. Aktive onkogenler tiroid malignitelerinde ve ayrıca tiroid adenomu ve hiperplazisinde tanımlanmıştır. Aktive edilmiş onkogenlerin ürünlerinin çoğu, mitojenle aktive olan protein kinaz kaskadı (MAPK) ve cAMP'ye bağımlı protein kinaz (PKA) aracılığıyla çalışan proteinlerdir. Normalde, sinyaller plazma membranından sitozolik ve nükleer hedeflere ilerleyerek çoğalma, diferansiyasyon, stres yanıtı, apoptoz ve hücre döngüsü gibi temel hücresel süreçleri yöneten bir dizi düzenleyici molekülü aktive eder. Bu ağda meydana gelebilecek bir kusur, neoplastik dönüşüme yol açabilir (40,41).

Ras, G-proteini türünde bir proto-onkogen ve bunu kodlayan genin adıdır. Ras onkogenleri, birbirleriyle ilişkili beş onkogenden oluşan bir gruptur. Bu aileye mensup proteinler proto-onkogendir; etkin hâle geldiklerinde onkogen işlevi görmeye başlarlar ve kanser patogenezinde önemli rol oynarlar. Ras onkogenleri (H-K ve N-ras), diğer karsinomlarda (pankreas, kolon, deri) olduğu gibi tiroid karsinomunda da aktive olur. Ras, reseptörlerden mitojenik sinyalleri (TSH, EGF, IGF-I, vb.) ileten G-alfa-1 gibi küçük monomerik G proteinlerini (GTP binding) kodlar. GTPaz aktive edici proteine bağlı kalan Ras, adenilat siklaz ve kalsiyum kanallarını aktive eder. Bu onkogenin varlığı makro ve mikro foliküler adenomlarda (%35), foliküler karsinomlarda (%32) ve anaplastik karsinomlarda (%58) görülmektedir. Ras, adenomlar ve hatta multinodüler guatr gibi iyi huylu lezyonlarda da bulunur; bu, Ras aktivasyonunun bir başlatıcı olay olduğunu ve

maligniteye ilerlemede hala bilinmeyen genetik değişikliklerin rol oynadığını düşündürür. Papiller karsinomda Ras varlığı tartışmalıdır bazı serilerde %50'den fazla pozitif vaka sıklığı bildirilirken, diğer serilerde Ras çok daha düşük yüzdelerde tespit edilmiş ya da hiç tespit edilmemiştir. Bu farklılık araştırmanın yapıldığı bölgenin iyot arzına bağlanmıştır. Papiller kanserde iyot eksikliği düşük Ras prevalansına neden olurken, iyot yeterli bölgelerde yüksek prevalans bulunur. Foliküler karsinom için bunun tersi geçerlidir, yani iyot eksikliği olan bölgelerde Ras pozitifliği yüksek prevalans; iyotun yeterli olduğu bölgelerde Ras pozitifliği düşük prevalans göstermektedir (42).

BRAF, Ras tarafından bağlanıp aktive edildikten sonra hücre zarına yer değiştiren bir serin-treonin kinazdır, bu da MAPK kinazın fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır. Tiroid kanserinde BRAF, nokta mutasyonları, küçük inframe delesyonlar-eklemeler veya kromozomal yeniden düzenleme ile aktive edilebilir. En yaygın aktivasyon mekanizması, nükleotid pozisyonu 1799'da bir timinden adenin ikamesini içeren bir nokta mutasyonudur ve bu, kalıntı 600'de (Val600Glu) bir valin-glutamat değişimi ile sonuçlanır. Bu mutasyon tiroid kanserinde bulunan tüm BRAF mutasyonlarının %98-99'u oluşturur. Diğer değişiklikler, bir Lys601Glu nokta mutasyonunu ve kodon 600'ü çevreleyen küçük, çerçeve içi eklemeleri veya delesyonları ve ayrıca AKAP9/BRAF yeniden düzenlemesini içerir. Yeniden düzenleme, BRAF geninin protein kinaz alanını kodlayan kısmı ile AKAP9 geni arasındaki füzyona yol açan kromozom 7q'nun parasentrik bir inversiyonudur. Tüm nokta mutasyonları ve yeniden düzenlemeler sonuç olarak BRAF kinazın aktivasyonuna ve MAPK yolunun kronik uyarılmasına yol açar (43). BRAF Val600Glu amino asit ikamesi, papiller tiroid kanserinde en sık görülen genetik değişikliktir. Papiller kanserlerin %40-45'inde bulunur. Mutasyon ayrıca kötü diferansiye tiroid karsinomlarının %20-40'ında ve anaplastik tiroid karsinomlarının %30-40'ında görülür. Papiller tiroid kanserinde, BRAF Val600Glu ikamesi tipik olarak klasik papiller ve tall cell histolojiye sahip tümörlerde bulunur ve foliküler varyantta nadirdir. Buna karşılık, Lys601Glu amino asit ikamesine neden olan BRAF mutasyonunu barındıran tümörler tipik olarak papiller karsinom histolojisinin foliküler varyantına sahiptir (40,42).

PAX8/PPAR γ yeniden düzenlemesi bir transkripsiyon faktörünü kodlayan PAX8 geninin bir kısmı ile PPAR γ geni arasındaki füzyona yol açarak kimerik PAX8/PPAR γ proteininin aşırı ekspresyonuna sebep olur. PAX8/PPAR γ , %30-35 (Tablo 1) sıklıkta meydana geldiği foliküler tiroid karsinomunda bulunan prototipik bir değişikliktir. Ayrıca, bu yeniden düzenleme bazı foliküler adenomlarda (%2-13) ve papiller karsinomların foliküler varyantının küçük bir oranında da (%1-5) bulunmuştur. PAX8/ PPAR γ yeniden düzenlemeleri ve Ras nokta mutasyonları aynı tümörde nadiren birlikte bulunur; bu da bunların foliküler tiroid karsinomlarının gelişiminde farklı patojenetik yolları temsil ettiğini düşündürmektedir (40,42,44).

Gsp geninin mutasyonları ise adenilat siklazı aktive ederek GTP-az aktivitesinin deaktivasyonunu bozar. Bu mutasyon sıklıkla (%27) sıcak adenomlarda görülmektedir (34).

RET onkogeni, tiroid neoplazisinde yoğun olarak çalışılmış bir onkogendir. İki adet RET onkogeni vardır (RET/PTC (papiller karsinom) ve RET/MTC (medüller karsinom)). RET/PTC'nin genetik lezyonu, 10. kromozomda parasentrik bir inversiyondur. Etkisi, RET protoonkogeninin reseptör tirozin kinaz alanında tirozinin fosforilasyonudur. RET protoonkogeninin aktivasyonu, tirozin kinaz alanının diğer aktive edici genlerin terminal bölgesi ile füzyonu yoluyla gerçekleşir. Elde edilen füzyon proteini, tirozin kinaz aktivitesi gösterir. RET'in yeniden düzenlendiği gene göre, RET'in üç izoformu tanımlanmıştır. RET/PTC1, H4/D10S170 geni ile yeniden düzenlenir. Bu izoform, PTC'nin %48'inde meydana gelir. RET/PTC2, protein kinaz A'nın düzenleyici alt biriminin geni ile yeniden düzenlenir; PTC'nin %7'sinde bulunur. RET/PTC3, ELE I adlı bir gen ile yeniden düzenlenir. PTC'nin %45'inde bulunur. Bu izoformun Çernobil sonrası papiller tiroid tümörlerinde yükseldiği bulunmuştur, bu da RET rearanjmanının radyasyona maruz kalma ile indüklendiğini düşündürmektedir (40). RET'in aktivasyonu bir nokta mutasyonundan değil, 10. Kromozomun uzun kolundaki bir yeniden düzenlemeden (RET/PTC1: parasentrik inversiyon ve RET/PTC2: karşılıklı dengeli translokasyon) kaynaklanmaktadır (45). Papiller karsinomda RET prevalansında coğrafik orjine göre önemli farklılıklar bulunmaktadır (46). RET/MTC, normal foliküler hücrelerde değil, C hücrelerinde eksprese edilir ve bilinen neoplastik bir

hastalık olan MEN'de bir germ line mutasyonu olarak nokta mutasyonu ile aktive olduğu bulunmuştur. RET/MTC, MAPKC aracılığıyla etki eder ve farklı klinik ekspresyonlarında çoklu endokrin neoplazilere neden olabilir (47). c-MET onkogeni ayrıca, işlevi hepatosit büyüme faktörü (HGF) veya saçılma faktörü olarak bilinen bir polipeptidin reseptörü olan bir tirozin kinazı da kodlar. Yapısal olarak bir heterodimerdir. Met/HGF birkaç normal insan dokusunda ve karsinomalarda eksprese edilir. Tiroid karsinomlarının %50'sinde, özellikle papiller karsinomda aşırı eksprese edilir. Aşırı ekspresyon, foliküler hücrelerden kaynaklanan karsinomlarla sınırlıdır ve medüller karsinomda negatiftir. Met/HGF, agresif bir papiller karsinom fenotipi (tall cell) ile ilişkilidir. Met/HGF reseptörünün aşırı ekspresyonunun, daha agresif bir davranışın kazanılması yoluyla maligniteye doğru ilerlemeye katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (48).

TRK, tirozin kinaz gen ailesine aittir. TRK, sinir büyüme faktörü için reseptörlerden birini temsil eden bir hücre yüzeyi tirozin kinaz proteinini kodlar. TRK, periferik sinir ganglionları ile sınırlıdır. Protoonkogen NTRK1, NTRK1 5' bölgesinin aktive edici bir gen tarafından sağlanan dizilerle değiştirildiği kromozomal yeniden düzenlemelerle onkojenik aktivasyona uğrar. TRK, ilk kez bir kolon karsinomu vakasında onkogen olarak tanımlandı. Tiroidde TRK'nın sadece papiller karsinomlarda aktive olduğu bulunmuştur (34). EGF-R'nin anaplastik karsinomlarda aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (49).

Diferansiye bir tiroid neoplastik nodülünün andiferansiye bir kansere doğru evrimi, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu veya fonksiyon kaybından kaynaklanmaktadır. p53, normal hücre proliferasyonunun kontrolünde rol oynayan bir nükleer proteindir. p53'ün işlevi, kanserlerde genomik kararsızlığın gelişiminde bir fren görevi görmektir. p53, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğramış gendir. P53'ün nokta mutasyonları, aynı bölgeden mutasyona uğrayan ras ve gsp'nin aksine molekülün evrimsel olarak korunan birçok bölgesinde meydana gelebilir. Tiroid kanserinde p53 mutasyonu agresif, farklılaşmamış neoplastik fenotipe ilerlemenin belirlenmesinde rol oynayabilir. Mutasyona uğramış p53, anaplastik tiroid kanserinde bulunur (50).

Hep birlikte ele alındığında, protoonkogenleri onkogenlere aktive eden mutasyonlar, tiroid tümorogenezinde temel adımdır, ancak ek genlerin kanseri oluşturmak için başlatıcı olayla iş birliği yapması gerekir. RET veya ras tarafından başlatılan bir tümörün, ek mutasyonların bir sonucu olarak ilerleyebileceği ve bir p53 mutasyonu ile daha az diferansiye karsinoma ilerleyebileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, onkogenin tiroid karsinogenezindeki rolünü in vivo veya in vitro güçlendirmek için, aktive edilmiş onkojenin uygulanmasının tümörü indükleyebildiği bulunmuştur. Normal tiroid hücrelerinde mutasyona uğramış ras geninin in vitro transferi, proliferasyonun belirgin olarak uyarılmasına yol açar (34, 40).

Tablo 1. Tiroid kanserinde genetik mutasyonların prevalansları

TİROİD KANSERİNDE MUTASYONLARIN PREVALANSLARI	
Tümör Tipi	Prevalans (%)
Papiller Karsinom	
BRAF	45
RET/PTC	20
RAS	10
TRK	<5
Foliküler Karsinom	
RAS	45
PAX8-PPAR	35
PIK3CA	<10
PTEN	<10
Az Diferansiye Karsinom	
RAS	35
β -catenin	20
TP53	20
BRAF	15
Anaplastik Karsinom	
TP53	70
β -catenin	65
RAS	55
BRAF	20

PIK3CA	20
PTEN	>10
Medüller Karsinom	
Familyal RET	>95
Sporadik RET	40



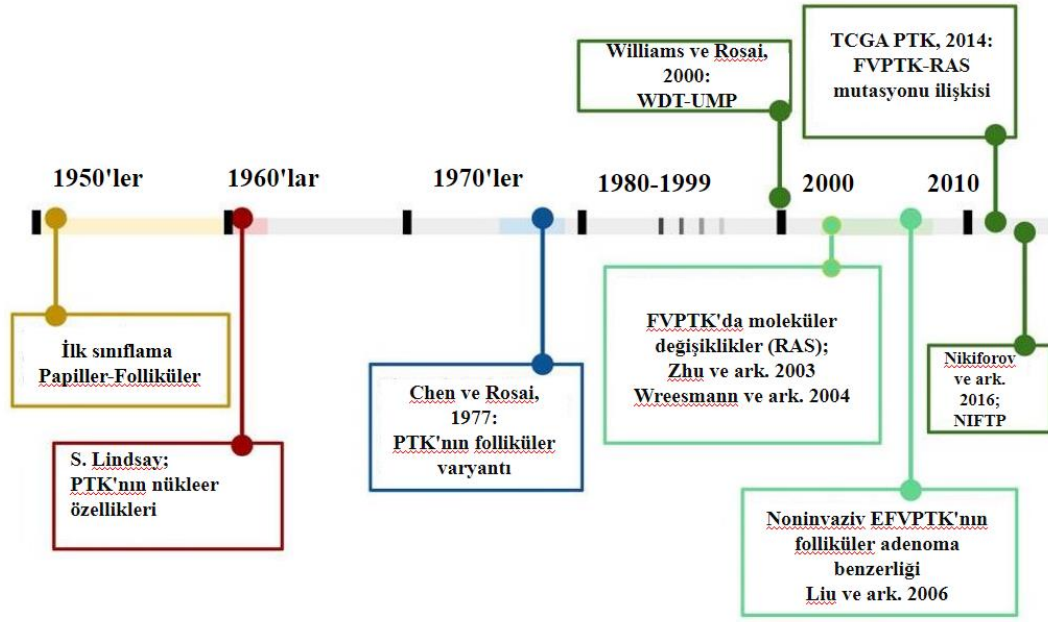
2.6. Tiroid Neoplazmalarının Histolojik Sınıflandırması

Tiroid tümörlerinin WHO sınıflandırması (Tablo 2) 1950'lerden günümüze kadar revizyonlar ile geliştirilmiş ve genelde iyi prognozlu seyreden düşük mortalite ile ilişkili bu karsinomların overdiagnozundan kaçınmak daha doğru bir tedavi planı ortaya koymak amaçlanmıştır (Şekil 5).

WHO tiroid tümörü sınıflandırmasının her baskısında PTK için tanı kriterleri üzerinde revizyonlar gerçekleşmiştir. İlk baskıda, PTK, papiller yapı içeren (nükleer özelliklerden bağımsız olarak) malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanmaktaydı. PTK tipi nükleer özellikler, ikinci ve üçüncü baskılarda malignite için temel kriterler haline getirildi. Dördüncü baskıda, patoloğlar arasında tanısal uyumsuzluğu azaltmak için "sınırdaki bir tümör varlığı" terimi dahil edildi ve RAS tipi PTK için bir nükleer skor kılavuzu eklendi. Ayrıca, düşük riskli PTK'ların aşırı teşhisini ve aşırı tedavisini azaltmak da amaçlandı. Dördüncü baskı, PTK tanımı daha da değiştirildi ve "PTK, foliküler hücre farklılaşması ve bir dizi ayırt edici nükleer özellik gösteren malign bir epitelyal tümördür. PTK genellikle invazivdir. Papilla invazyonu veya PTK'nın sitolojik özellikleri gereklidir." olarak tanımlandı. Bu değişiklikler aynı zamanda düşük riskli PTK'ların aşırı teşhisini ve aşırı tedavisini azaltmayı amaçladığı için invazyonu net olmayan kapsüllü PTK'ların çoğu borderline tümör kategorisine indirilmiştir (iyi diferansiye belirsiz malign potansiyelli tümör (WDT-UMP) ve invaziv olmayan papiller benzeri nükleer özelliklerle sahip foliküler tiroid neoplazması (NIFTP)) Dördüncü baskı WHO sınıflandırmasında FTK, üç prognostik grupta sınıflandırılmıştır: 1) Minimal invaziv (yalnızca kapsüller invaziv) FTK, 2) Kapsüllü anjiyoinvaziv FTK, 3) Yaygın anjiyoinvaziv invaziv FTK. Düşük riskli FTK (minimal invaziv FTK), daha katı kapsüller ve vasküler invazyon kriterleri kullanılarak borderline tümör kategorisine (belirsiz malign potansiyele sahip foliküler tümör [FT-UMP]) indirgenmiştir. Bu şekilde düşük riskli FTK'lar için overtreatmenti azaltmayı amaçlamıştır (51).

Tablo 2. WHO (2017) Tiroid Kanser Sınıflaması

Foliküler adenom	Müsinöz karsinom
Hyalinize trabeküler tümör	Ektopik timoma
Kapsüllü folliküler paternde diğer tiroid tümörleri	Timus benzeri diferansiyasyon gösteren içsi epitelyal tümör
Malign potansiyeli belirsiz folliküler tümör	İntratiroidik timik karsinom
Malign potansiyeli belirsiz iyi diferansiye tümör	Paraganglioma ve mezenkimal / stromal tümörler
Papiller benzeri nükleer özellikler içeren noninvaziv folliküler tiroid neoplazmı	Paraganglioma
Papiller tiroid karsinomu	Periferik sinir kılıfı tümörleri
Papiller karsinom	Schwannoma
Foliküler varyant	Malign
Enkapsüle varyant	Benign vasküler tümörler
Papiller mikrokarsinom	Hemanjiom
Kolumnar hücreli varyant	Kavernöz hemanjiom
Onkositik varyant	Lenfanjiom
Foliküler tiroid karsinomu	Anjiosarkom
FTK, minimal invaziv	Düz kas tümörleri
FTK, enkapsüle anjioinvaziv	Leiomyom
FTK, yaygın invaziv	Leiomyosarcom
Hurthle (onkositik) hücreli tümörler	Soliter fibröz tümör
Hurthle hücreli adenom	Hematolenfoid tümörler
Hurthle hücreli karsinom	Langerhans hücreli histiositoz
Az diferansiye tiroid karsinomu	Rosai-Dorfman hastalığı
Anaplastik tiroid karsinomu	Foliküler dendritik hücreli sarkom
Skuamoz hücreli karsinom	Primer tiroid lenfoması
Meduller tiroid karsinomu	Germ hücreli tümörler
Mikst meduller ve folliküler tiroid karsinomu	Benign teratom
Mukoepidermoid karsinom	Immatur teratom
Eozinofil gösteren sklerozan mukoepidermoid karsinom	Malignant teratom
	Sekonder tümörler

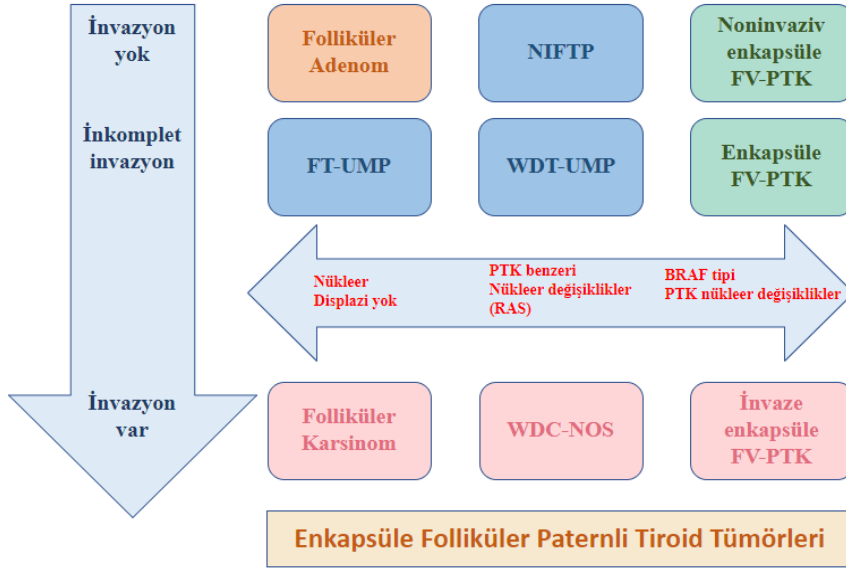


Şekil 5. Tiroid neoplazmlarının histolojik sınıflandırmasının zaman içerisinde değişimi

2.6.1. Folliküler Adenom ve Borderline Tümörler

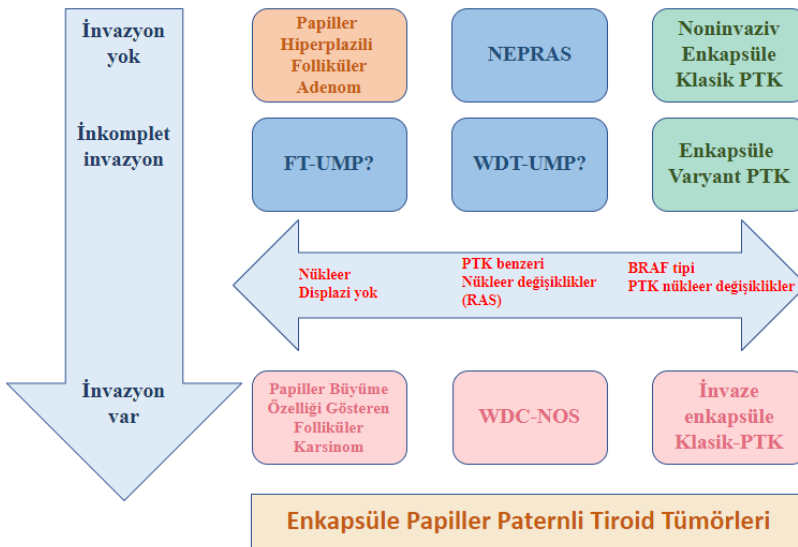
Borderline tümörlerin (hyalinize trabeküler tümör, NIFTP ve malign potansiyeli belirsiz tümörler) tiroid tümör sınıflandırmasına dahil edilmesi, tiroid patoloji pratiğinde çığır açan bir değişikliktir. Bu değişiklikle, tiroid tümörleri nüks/metastaz olasılığına göre; iyi huylu tümörlerde ihmal edilebilir risk (<%0,1), borderline tümörlerde çok düşük risk (<%1) ve kötü huylu tümörlerde yüksek risk olarak üç risk grubuna ayrılır.

2017 WHO sınıflandırmasında foliküler adenom tanımı değiştirildi. Foliküler adenom, PTK'nın nükleer özellikleri olmaksızın, tiroid foliküler hücre diferansiyasyon kanıtlarını gösteren, iyi huylu, kapsüllü, invaziv olmayan bir neoplazm olarak tanımlandı. 2004 WHO tiroid tümörleri sınıflandırması tarafından önceki tanıma "PTK'nın nükleer özellikleri olmayan" ifadesi eklenmiştir yeni tanıma göre PTK benzeri nükleer özelliklere sahip, invaziv olmayan, kapsüllü, foliküler paternli tümörler NIFTP veya WDTUMP'de sınıflandırılır (Şekil 6-8) (52).

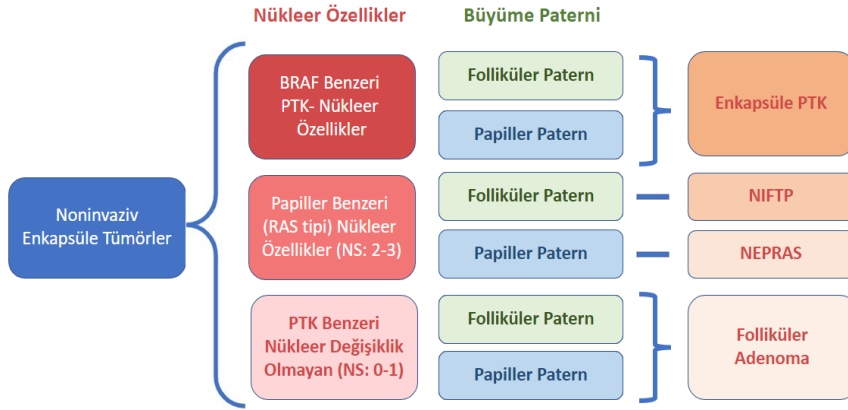


Şekil 6. Kapsüllü folliküler patern tiroid tümörlerinin şematik açıklaması

Son yapılan çalışmalarda mevcut WHO sınıflamasında papiller büyüme paterni olan borderline/prekürsör tiroid tümörleri için kriterler açıkça tanımlanmamış olup teşhiste gözlemci varyasyonundan çok etkilendiği bildirilmiştir. Ohba ve ark. yakın zamanda papiller büyüme paterni olan yeni bir borderline tiroid tümör kriteri önerdi ve bunu noninvaziv kapsüllü papiller RAS-benzeri tiroid tümörü (NEPRAS) olarak adlandırdı (Şekil 7-8) (53). Sonraki çalışmalarda daha fazla NEPRAS vakası bildirdi (54).



Şekil 7. Kapsüllü papiller patern tiroid tümörlerinin şematik açıklaması



Şekil 8. Kapsüllü papiller tiroid kansinomu dahil olmak üzere dört farklı noninvaziv kapsüllü tiroid tümörünün nasıl sınıflandırılacağına şematik açıklaması

2.6.2. Hyalinize Trabeküler Tümör

Hyalinize trabeküler tümör, çok düşük malign potansiyele sahip, foliküler hücre kökenli nadir bir tiroid neoplazmadır. Tümör, 2004 WHO sınıflandırmasında benign bir "tiroid adenomu ve ilgili tümörler" grubundan, 2017 WHO'da ICD-O davranış kodu ile belirsiz davranışlı bir neoplazm olarak ayrı bir kategoriye taşındı. Hyalinize trabeküler tümörler çok iyi bir prognoza sahiptir. Bugüne kadar, akciğer metastazı olan sadece bir vaka bildirilmiştir ve başka bir vakada bölgesel lenf nodu metastazı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu vakalar enkapsüle solid/trabeküler PTK'nın yanlış teşhisi olarak eleştirilmiştir. Hyalinize trabeküler tümörler, intranükleer oluklar ve psödoinklüzyonlar dahil olmak üzere PTK tipi nükleer özelliklere sahip olduklarından, ince iğne aspirasyon sitolojisinde teşhis edilmeleri zordur. Bu sebeple tümörlerin yarısından fazlası PTK veya PTK için şüpheli olarak teşhis edilmektedir (55).

Önceki çalışmalarda RET/PTC füzyonları PTK'nın karakteristiği olan bildirilmiş olmasına rağmen, güncel çalışmalar, daha doğru moleküler tanı yöntemleri kullanılarak tümörlerde RET/PTC yeniden düzenlenmesi olmadığını doğrulamıştır. Son çalışmalar, PAX8/GLIS füzyonlarının, hyalinize trabeküler tümörün genetik bir özelliği olduğunu bildirmiştir. Bugüne kadar diğer tiroid tümör türlerinde PAX8/GLIS füzyonu bulunmamıştır (56).

2.6.3. Papiller Tiroid Karsinomu

Papiller tiroid karsinomu, foliküler hücre diferansiyasyonu ve bir dizi farklı nükleer özellik gösteren malign epitelyal karakterde bir tümördür. Genellikle invaziv tümörlerdir. Papilla varlığı, invazyon ve papiller tiroid karsinomuna özel nükleer özelliklerin bulunması tanı için gereklidir. PTK'ları familial adenomatöz polipozis coli, Cowden sendromu, herediter nonpolipozis kolon kanser sendromu, Peutz-Jeghers sendromu ve ataksi telenjektazi sendromlarına da eşlik edebilir. Papiller karsinom çocuk ve yetişkinlerin en sık görülen tiroid kanser tipidir. Bu tümörler biyolojik davranış açısından sessiz gidişli olma eğilimindedir. Prognozları çok iyidir. Lenfatik invazyon eğilimi nedeniyle multifokal lezyon ve bölgesel lenf nodu metastazı görülür. PTK en sık 4-5. dekatlarda görülür (57). Papiller tiroid karsinomu için tanı kriterinin değişmesiyle birçok PTK varyantı tanımlanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Papiller tiroid kanseri varyantlarının tanısında histolojik kriterler

Varyant	Varyant Tümör Hücrelerinin Oranı	Histolojik Özellikler
Foliküler Varyant	Büyük Çoğunluğu	Gerçek papilla yok, foliküler büyüme, PTK nükleer özellikleri
Tall Cell Varyant	>30	Uzamış foliküler Boyu eninden 2-3 kat daha fazla, bol eozinofilik sitoplazma, keskin hücre sınırları
Kolumnar Cell Varyant	>30	Tall cell'e göre daha elonge hücreler Yalancı çok katlı hiperkromatik nükleuslar, subnükleer sitoplazmik vakuoller
Hobnail Varyant	>30	Selüler kohezyon kaybı, mikropapiller, apikalde yerleşik nükleuslar, belirgin nükleoluslar, pleomorfik nükleuslar, mitoz
Solid Varyant	Tamamına yakını	Solid, trabekuler ya da insuler büyüme, PTK nükleer özellikleri, yüksek mitozun ve nekrozun yokluğu
Diffüz Sklerozan Varyant		Yoğun skleroz, sayısız psammoma cisimcikleri, lenfatik invazyon, kronik lenfositik tiroidit, skuamöz metaplazi

PTK varyantları arasında tall cell, kolumnar hücreli ve hobnail varyantları, klasik ve kapsüllü PTK'dan daha agresif klinik özellikler ve daha kötü prognoz ile ilişkili varyantlardır. 2015 Amerikan Tiroid Birliği risk sınıflandırma sisteminde, bu üç agresif varyantı olan hastalar orta düzeyde nüks riskine sahip olarak sınıflandırılır (58). Solid ve diffüz sklerozan varyantlar bazı araştırmacılar tarafından PTK'nın agresif varyantları olarak görülse de biyolojik davranışları hala tartışmalıdır. Büyük bir tiroid kanseri kohortu üzerinde yapılan bir çalışmada, son yirmi yılda agresif PTK'ların insidansında, iyi diferansiye PTK'larda veya anaplastik tiroid karsinomlarında görülenden daha yüksek bir oranda bir artış gözlemlendi (59).

Tall cell varyantı; mevcut WHO sınıflandırmasında; "tümör hücrelerinin en az %30'unun uzunluğu genişliğinden 2-3 kat fazladır" şeklinde revize edilmiştir, oysa WHO sınıflandırmasının önceki baskısında, tall cell varyantında "uzunluk genişliğin 3 katı olmalı" şekline kabul edilmekteydi (60). Tanımdaki revizyon, daha fazla PTK vakasının bu varyanta dahil edilmesine neden olmaktadır ve bu nedenle varyanta ait hastalısız sağ kalım oranları artmış olarak izlenmektedir (61). Agresif varyantlar arasında en sık izlenen tall cell hasta yaşı ve tümör boyutundan bağımsız şekilde kötü prognostik belirteç olarak kabul edilir (62). %10 tall cell değişikliğine sahip PTK'ların tall cell olmayanlara göre daha kötü prognoza sahip olduğuna ve fokal tall cell değişikliğine (\geq %10) sahip PTK'ların düşük risk sınıflandırmasının ötesinde rapor edilmesi ve ele alınması gerektiğine dair artan kanıtlar vardır (63). Tall cell varyantı tanısı atlanmamalıdır, çünkü bu varyant radyoaktif iyot ablasyonuna daha dirençlidir ve klasik PTK'lı hastalara göre daha kötü prognoza sahiptir. Daha yaşlı hastalarda görülme eğilimindedirler. Kadınlarda erkeklerden daha sık izlenir. İnsidansı %1,3-%13 arasında bildirilmektedir (64). BRAF V600E ve TERT promotor mutasyonları gösterirler. TERT mutasyonu tümör relapsından sorumludur. TERT ve BRAF mutasyonunu beraber gösterenler sadece BRAF mutasyonu gösterenlerden daha kötü prognoza sahiplerdir (65).

Kolumnar cell varyantı; belirgin yalancı tabakalı hiperkromatik çekirdeklere sahip ve geleneksel PTC nükleer özelliklerinin bulunmadığı kolumnar hücrelerden oluşur (66). Bağırsağa özgü nükleer transkripsiyon faktörü olan CDX2'nin, bu varyantta %10 ila %55'inde pozitif olması ilginç bir bulgudur. Tüm PTC'lerin

%0.15-0.2'sini oluşturan nadir bir alt tiptir (67). Revize edilmiş Amerikan Tiroid Birliği kılavuzları bu varyantı agresif tip olarak sınıflandırmıştır. Hızlı büyüme hızına ve yüksek nüks insidansına sahiptir, lokal invazyon ve erken lenf nodu metastazı ile ilişkilidir. Prognozu tartışmalıdır, çünkü kapsüllenmiş form, nispeten yavaş büyüme ve düşük nüks veya metastaza sahiptir (68).

Hobnail varyant, nadirdir ve tüm PTK vakalarının <%3'ünü oluşturur. Hobnail varyant tanısı için tümör %30 dan fazla hobnail hücre içermelidir. Hobnail görünümüyle birlikte mikropapiller formasyon da gösterirler. Kadınlarda daha sık görünür ve agresif gidişe sahiptir. BRAF ve p53 en sık görülen mutasyonlardır. Radyoaktif iyot uptake refrakter tümörlerdir (69).

Solid/trabeküler varyant; tümörün %50'den fazlası solid / trabeküler / yuvalanmış (nested) bileşenlerden oluştuğunda ve diğer varyantlar ekarte edildiğinde tanımlanmalıdır. Geleneksel PTK nükleer özellikleri olmayan ve yüksek mitotik indeks ve/veya nekroz bulunduran solid varyant PTK'ların bir alt kümesi olan az diferansiye tiroid kanser için tanı kriterlerini karşılar ve bu nedenle şu anda az diferansiye tiroid kanser olarak sınıflandırılmaktadır (70). Bu varyant iyonize radyasyon maruziyeti ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve genç hastalarda ve pediyatrik yaş grubunda daha sık görülür. Radyasyonla ilişkili pediyatrik vakalar sıklıkla RET/PTC3 rearanjmanı gösterirler, sporadik vakalar ise RET/PTC1/3 ve ETV6/NTRK3 füzyonlarını gösterir (71). Solid/trabeküler varyantın agresif varyant olarak kabul edilip edilmeyeceği tartışmalıdır. Daha önceki bazı çalışmalar, bu varyanta sahip PTK'lı hastaların klasik PTK'lı hastalardan daha kötü bir prognoz gösterdiğini bildirirken, sonraki çalışmalar varyantlar arasında prognoz açısından hiçbir fark olmadığını gösterilmektedir (72).

Diffüz sklerozan varyant; genellikle tiroid bezinin hızlı ve diffüz büyümesi ile ortaya çıkar, tiroid bezinde geniş alanları hatta tüm tiroid bezini tutabilir. Diffüz sklerozan varyant, klinik olarak otoimmün tiroidit ile karıştırılabilir. PTK'lı hastalarda prevalansı %0,7-%6,6'dır. En sık genç erişkinlerde ve çocuklarda görülür. Belirgin stromal fibrozis, yoğun lenfositik infiltrasyon, çok sayıda psammom cisimciği ve skuamöz metaplazi odakları ve ayrıca sık lenfovasküler

invazyon ile karakterizedir. RET/PTC mutasyonları sıktır (73). BRAF V600E mutasyonu bu varyantta nadirdir. Bu varyant ekstratiroidal yayılım, servikal lenf nodu ve uzak metastaz ve daha kısa hastaliksız sağkalım ile ilişkili olmakla birlikte mortalite aynı oranda kötü değildir. Daha yüksek bir nüks oranına rağmen uzun süreli sağkalımın daha genç hasta yaşının olumlu etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (74).

Papiller pikrokarsinoma; papiller karsinomun mikrokarsinom olarak adlandırılması için tümörün çapının 1 cm'ye eşit veya küçük olması gerekir. Papiller mikrokarsinoma insidansı dikkatle, ince kesitler atılmış bir tiroid glandında %36'ya kadar çıkabilmektedir. Familial formu mevcuttur (75).

Enkapsüle varyant; yapısal ve sitolojik olarak PTK özelliği gösterir. Fokal infiltrate ya da intakt fibröz kapsül gösterir (76)

Foliküler varyant; bu tümörler sadece foliküler büyüme paterni gösterir. İnfiltratif ve invaziv olarak iki alt tipi vardır (76).

Onkositik varyant; pür form olarak görülmesi son derece nadirdir. Tall cell varyanta benzerliği nedeniyle ayırım yapılması önemlidir (76).

İğsi hücreli (spindle cell) varyant; seyrek olarak PTK fokal alanlarda iğsi hücreli metaplazi gösterir. Anaplastik karsinomdan mitoz ve nekroz olmayışı ile ayrılır (76).

Şeffaf hücreli (clear cell) varyant; çok nadirdir; şeffaf hücreli medüller karsinom ile intratiroidal proliferasyonlar ve metastatik renal cell karsinomdan ayrılmalıdır (76).

Warthin benzeri varyant; genelde iyi sınırlı ve tükürük bezinin Warthin tümörüne benzer histolojik görünüm gösterir (76). Kronik lenfositik tiroidit zemininde papiller yapı gösterir. BRAFV600E mutasyonu göstermezler (75).

Kribriiform morular varyant; hemen daima kadınlarda görülür (76). FAB sendromlu hastalarda %1-2 oranında görünür. Tüm vakalar APC germline mutasyonu gösterir. Bazı olgularda RET/PTK gen aktivasyonu vardır. BRAF mutasyonu hiçbir zaman izlenmez. (75)

Fibromatozis/ fasitis benzeri stroma gösteren papiller tiroid karsinomu, nadirdir, fibroblastik tümörlere benzer özellikler gösterir (76).

2.6.4. Foliküler Tiroid Karsinomu (FTK)

FTK foliküler hücrelerden köken alır. PTK'nın tanısal nükleer özelliklerini göstermezler. Bu tümörler genelde kapsüllü ve invaziv büyüme paterni gösterirler. Yetişkinlerde sık, çocuklarda nadirdir. WHO 2017 sınıflamasında ise tanımlanan 3 ayrı subtipi vardır:

- Foliküler tiroid karsinomu, minimal invaziv: Sadece kapsül invazyonu gösterir.
- Foliküler tiroid karsinomu, kapsüllü anjiyoinvaziv: Bu tümör damar boyutu önemli olmaksızın ven invazyonu gösterir. 4'ten az damar invazyonu gösteren tümörler daha iyi prognoz gösterir (76).
- Foliküler tiroid karsinomu, yaygın invaziv: Bu tipte tiroid dışı yumuşak dokulara yaygın invazyon vardır.

2.6.4.1. Foliküler Tiroid Karsinomu Varyantları

Şeffaf hücreli varyant %50'den fazla şeffaf hücre içerir. Metastatik şeffaf hücreli karsinomların ekarte edilmesi gerekir. Çok nadir görülen varyant olan Taşlı yüzük hücreli tip, metastatik müsinöz karsinomlardan ayrılmalıdır.

Diğer çok nadir görülen paternler glomeruloid ve iğsi hücreli paternidir. Sadece kapsüler invazyon gösteren foliküler karsinomların prognozları çok iyidir. Vasküler invazyon gösteren tümörler hematogen yayılım yoluyla en sık kemik, akciğer, beyin ve karaciğere uzak metastaz yaparlar. Bu tümörlerde TERT

mutasyonu (telomerase reverse transcriptase) rekürrens riski ve mortalite açısından bağımsız bir belirteçtir (76).

2.6.5. Hurtle (Onkositik) Hücreli Tümörler

Hurthle hücreli tümörler genelde kapsüllüdür. Lezyonların %75'inden fazlası onkositik hücrelerden meydana gelir. Noninvaziv olanlar adenom olarak isim alır. Kapsüller ve/veya kapsüler invazyon gösterenler hurthle hücreli karsinom adını alır. Erkeklerde daha sık görülür. PTK ve FTK'ya göre daha yaşlı hastaları etkiler. Hurthle hücreli karsinomlar daha büyük ve daha yüksek evreli tümörler olup diğer tiroid karsinomu hastalarından daha kısa yaşam süresi gösterirler. Diğer tiroid tümörlerine göre daha belirgin mitokondrial DNA mutasyon sıklığı gösterirler. Radyoyot rezistan olduklarından tedavi seçenekleri daha sınırlıdır (76).

2.6.6. Az Diferansiye Tiroid Karsinomu

Foliküler hücre kökenli olmakla birlikte foliküler diferansiasyonun bulguları sınırlıdır. Histopatolojik görünüm ve biyolojik davranış olarak PTK ve FTK ile anaplastik karsinom arası davranış gösterirler (77). Klasik papiller tiroid karsinomuna özgü nükleer özellikleri göstermez iken histopatolojik olarak mitoz, nekroz ve farklı nükleer özellikler gösterirler. İyi diferansiye tümörler ile kötü gidişli anaplastik karsinom arasında orta derecede prognoza sahip olan bu tümörler hakkında farkında olunması gereken bir özellik de hastada tümör yükünü değerlendirirken serum tiroglobulin seviyesinin güvenilir olmayabileceğidir. Köken aldıkları ana tiroid hücrelere benzerlikleri (diferansiasyonları) çok düşük olduğundan bu tümörler tiroglobulin proteinini yeterince salgılamayabilirler (78).

2.6.7. Anaplastik Tiroid Karsinom

Herhangi bir farklılaşma göstermeyen Foliküler tiroit hücrelerinden meydana gelen biyolojik davranış olarak son derece kötü Seyirli bir tümördür. andiferansiye tiroid karsinomu olarak daha adlandırılır %1 oranında görülür (79).

2.6.8. Skuamöz Hücreli Karsinom

Tümüyle skuamöz hücre diferansiasyonu gösteren hücrelerden oluşan malign epitelyal tümördür. Epidermoid karsinom ile eş anlamlıdır. Prognozu anaplastik karsinom kadar kötüdür (76).

2.6.9. Meduller Tiroid Karsinomu

Tiroid malignitelerinin %2-3'ünü oluşturur. %70 sporadik formu görülmekle birlikte %30'u otozomal dominant RET onkogen mutasyonu sonucu ortaya çıkan kalıtsal tümörlerdir (76).

2.6.10. Mikst Meduller ve Follikuler Tiroid Karsinomu

Aynı tümörde folliküler ve parafolliküler hücre yönünde diferansiyasyon kanıtları gösteren hücrelerden oluşur. Mikst Folliküler ve C hücreli karsinom, mikst meduller ve papiller karsinom bu tümör için eş anlamlı olarak kullanılır (76).

2.6.11. Mukopeidermoid Karsinom

Tükürük bezi tümörlerinin taklit eden tümörlerdir. Adalar halinde skuamöz hücreler ve misin üreten glandlardan oluşur. Yavaş gidişli, düşük grade'li tümörlerdir (76, 80).

Eozinofil gösteren sklerozan mukopeidermoid karsinom, nadir görülen bir varyanttır, zeminde kronik lenfositik tiroidit mevcuttur (76).

2.6.12. Müsinöz Karsinom

Neoplastik hücreler yaygın ekstraselüler müsin ile çevrilidir. Çok nadir görülür (76).

2.6.13. İntratiroidik Timik Karsinom

Timus benzeri diferansiyasyon gösteren karsinom, intratiroidal epitelyal timoma, timus benzeri eleman gösteren karsinom (CASTLE) eş anlamlı kullanılan isimleridir. Total rezeksiyondan sonra prognozları çok iyidir (76).

2.7. Tiroid Nodüllerine Tanısal Yaklaşım

2.7.1. Anamnez ve Fizik Muayene

Tiroid nodülleri değerlendirilirken öncelikle hastanın anamnezi ayrıntılı şekilde alınmalıdır. Çocukluk çağında baş-boyun bölgesine radyasyon maruziyeti, ailede tiroid kanseri öyküsü, ailede sendromik hastalık öyküsü (Familial Polipozis Koli, Gardner, Cowden, MEN sendromları vs.) gibi durumlar mutlaka sorgulanmalıdır. Erkek cinsiyet, genç yaş (20 yaşından küçük), ileri yaş (altmış yaşından büyük) olmak da malignite için risk faktörleridir. Ağrı ve hassasiyet genellikle nodül içerisine kanamayı düşündürür. Benign bir nodülde kanamaya bağlı şikayetler birkaç hafta içerisinde kaybolur. Ağrı ve hassasiyetin invazyon belirtisi olabileceği de hatırdan çıkarılmamalıdır. Tiroiddeki nodül, bazen bir başka organdan kaynaklanan kansere ait metastaz da olabilir (81).

Fizik muayene en iyi baş hafif ekstansiyonda iken hastanın arkasına geçilerek yapılır. Fizik muayene bezin büyüklüğü, şekli ve yerleşimi konusunda bilgi sağlar. Bu yolla yaklaşık %5 oranında nodül varlığı saptanabilir. Parmak uçları ile nazıkçe yapılan muayenede tiroid bezinin şekli, yüzeyi değerlendirilir, örneğin sert ve lobüle yüzey varlığı Hashimoto tiroiditi için kuşku uyandırır. Nodüler yapı varlığı, kabaca glandın büyüklüğü, sıcaklık artışı değerlendirilir. Ayrıca bu muayene sırasında boyundaki lenf bezleri de değerlendirilmelidir. Çünkü tiroid kanserinde bazen ilk bulgu ele gelen lenf nodları olabilmektedir. Ayrıntılı anamnez fizik muayeneyi takiben tiroidin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli görüntüleme yöntemlerinden faydalanılmaktadır. En sık kullanılan ve yaygın olarak bulunan yöntem ultrasonografidir (USG). Bu yöntem morfolojik bilgi sağlarken, tiroid sintigrafisi ise öncelikle fonksiyonel görüntüleme sağlamaktadır.

2.7.2. Görüntüleme

2.7.2.1. Ultrasonografik Görüntüleme

Ultrasonografi nodüllerin saptanmasını ve özelliklerinin belirlenmesini sağlayan ve hangi nodüllerin ince iğne aspirasyon biyopsisi ile değerlendirilmesi gerektiğine karar vermede rol oynayan görüntüleme yöntemidir. Ayrıca ince iğne aspirasyon biyopsisi ve lokal tedaviler ultrason eşliğinde yapılmalıdır. Ultrasonografi ile nodüllerin boyutu, ekojenitesi, yapısı, mikro ve makrokalsifikasyon varlığı, kenar düzeni, periferik halo varlığı, biçimi ve kanlanması belirlenebilir. Bu özelliklerden hipoekojenite, mikrokalsifikasyon varlığı ve kenar düzensizliği malignite ile en çok ilişkilendirilmiş özelliklerdir. Tiroid Ultrasonu sırasında sadece tiroid bezinin değil boyundaki diğer yapılarında görüntülenebilmesi nodüllerin ayırıcı tanısında önemlidir (82-85). Ultrasonografik olarak şüpheli bir nodül varlığında boyunda patolojik görünümlü lenf nodu saptanması veya boyundaki diğer dokularda invazyon lehine görünüm olması nodülün malign olduğunu düşündürmektedir. Ultrason bulgularının hiçbiri tek başına malign tiroid nodülünü saptamada yeterli değildir (86). Son yıllarda geliştirilen elastosonografi dokuların sertliğinin kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesini sağlayan ultrasonografik bir yöntemdir, malign lezyonların benign lezyonlara göre palpasyonla daha sert olması esasının ultrasonografik olarak yansıtılmasını sağlamaktadır. Tiroid nodüllerinin ayırıcı tanısında kullanılan bu yöntem diğer gri-skala ultrason bulguları ile birleştirildiğinde yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmaktadır (87).

Hiçbir ultrason bulgusu maligniteyi öngörmeye tek başına yeterli olmadığından yola çıkılarak ultrason özelliklerinin birlikte kullanılması gündeme getirilmiş ve otörler tarafından günümüze kadar birçok değişiklik sınıflandırma sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerin amacı nodülleri yönetiminde ortak bir dil oluşturmak ve mümkün olan tüm tiroid hastalarını saptarken benign nodülleri olan hastaları da gereksiz işlemlerden korumaktır. Tiroid nodüllerine US ile kantitatif malignite risk sınıflandırma sistemi ilk olarak 2009 yılında Hovarth ve ark. tarafından geliştirilmiştir ve Thyroid Imaging Reporting and Data System (TIRADS)

ismi verilmiştir (89). American College of Radiology (ACR) tarafından 2017 yılında önerilen ACR-TIRADS risk sınıflandırmasında ise nodül yapısı, ekojenitesi, biçimi, kenar düzeni ve kalsifikasyon varlığından oluşan beş ultrason parametresi kullanılmıştır (90). Puanlama, ultrason bulgularının beş kategorisinden belirlenir. Kümülatif skor ne kadar yüksekse, TR (TI-RADS) seviyesi ve malignite olasılığı da o kadar yüksek olur. Aşağıdaki kategorilerin her birinden bir puan verilir:

Biçim:

- Kistik veya tamamen kistik: 0 puan
- Spongiform: 0 puan
- Mikst kistik ve solid: 1 puan
- Solid veya neredeyse tamamen solid: 2 puan

Ekojenite:

- Anekoik: 0 puan
- Hiper veya izoekoik: 1 puan
- Hipoekoik: 2 puan
- Çok hipoekoik: 3 puan

Şekil:

- Uzundan daha geniş: 0 puan
- Genişten daha uzun: 3 puan

Kenar yapısı:

- Pürüzsüz: 0 puan
- Kötü tanımlanmış: 0 puan
- Lobüle/düzensiz: 2 puan
- Tiroid dışı uzanım: 3 puan
- Son kategorideki tüm bulgular diğer dört puana da eklenir.

Ekojenik Odaklar: (bir veya daha fazlası)

- Hiçbiri: 0 puan
- Büyük kuyruklu yıldız eseri: 0 puan
- Makrokalsifikasyonlar: 1 puan
- Periferik/jant kalsifikasyonları: 2 puan
- Noktasal ekojenik odaklar: 3 puan

Birden fazla nodül mevcutsa, yalnızca en yüksek skorlu dört nodül (mutlaka en büyük değil) puanlanmalı, raporlanmalı ve izlenmelidir. Kistik veya spongioform nodüller genel olarak iyi huyludur. Bu özellikler mevcutsa başka puan eklenmez (otomatik olarak TR1).

Puanlama ve sınıflandırma

- TR1: 0 puan Benign
- TR2: 2 puan Şüpheli değil
- TR3: 3 puan Hafif şüpheli
- TR4: 4-6 puan Orta derecede şüpheli
- TR5: ≥ 7 puan Son derece şüpheli

Öneriler

- TR1: TİİAB gerekli değil
- TR2: TİİAB gerekmez
- TR3: $\geq 1,5$ cm takip, $\geq 2,5$ cm TİİAB
Takip: 1., 3. ve 5. yıl
- TR4: $\geq 1,0$ cm takip, $\geq 1,5$ cm TİİAB
Takip: 1., 2., 3. ve 5. yıl
- TR5: $\geq 0,5$ cm takip, $\geq 1,0$ cm TİİAB
5 yıla kadar yıllık takip

Yukarıdaki boyut kriterlerine sahip şüpheli lezyonlar (TR3-TR5) için TİİAB önerilir. Birden fazla nodül varsa, en yüksek ACR TI-RADS skoruna sahip ikisi (en büyük iki yerine) örneklenmelidir; aynı sınıflandırmaya ait birden fazla nodül varsa en büyük boyut bir tie-breaker olarak kullanılmalıdır (90). Takiplerde en az iki boyutta %20'den (en az 2 mm olacak şekilde) veya hacimde %50'den fazla artış varsa anlamlı olarak kabul edilir. Taramalar sırasında ACR TI-RADS seviyesi yükselirse, bir sonraki yıl tekrar tarama önerilir. (90-91).

Orijinal 2017 makalesinde öngörülen malignite riski, sitolojik sonuçlarla 3443 nodülün kısmi analizine dayanılarak hesaplanmıştır. Yayın sırasındaki kısmi analiz, TR1/TR2 için $< 2\%$, TR3 için 5% , TR4 için $5-20\%$ ve TR5 nodülleri için

>%20 oranlarını göstermektedir. Nihai analiz sonuçlarına göre oluşturulan malignite oranları (92): TR1: %0,3; TR2: %1,5; TR3: %4,8; TR4: %9,1; TR5: %35 olarak tanımlanmıştır. ACR sistemi, diğer tiroid raporlama sistemlerinden farklı olarak "normal tiroid bezi" için bir derecelendirme bulunmamaktadır.

Diğer sınıflandırma sistemleriyle karşılaştırma

ACR sistemi 2017 yılında yayınlandıktan sonra KTIRADS (2017) ve EUTIRADS (2017) yayınlandı. ATA, AACE, Kwak-TIRADS ve SRU şu an kullanımda olan diğer sınıflamalardandır. Karşılaştırmalı çalışmalar, ACR sisteminin %75-97 arasında değişen bir sensitivite ve %53-67 oranında spesifiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu oranlar bazı karşılaştırma çalışmalarında, ACR sisteminin karşılaştırılan sistemler arasında en yüksek sensitivite ve en düşük spesifiteye sahip (93) olduğunu gösterirken bazı çalışmalarda ise tam tersine en yüksek spesifiteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Son çalışmalarda ACR sisteminin ayrıca, daha düşük gereksiz ince iğne aspirasyon oranlarıyla sonuçlanan en yüksek genel performansa sahip olduğu bulunmuştur (94,95).

2.7.2.2. Radyonüklid Görüntüleme

Tiroid sintigrafisi, tiroid bezi hastalıklarının değerlendirilmesinde uzun zamandır kullanılan ve iyi bilinen bir görüntüleme yöntemidir. Tiroid bezinin gelişim, yapısal ve fonksiyonel hastalıklarının incelenmesinin yanında tedavi planlama ve izleme gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Tiroid sintigrafisi muayenede veya US'de saptanan nodüllerin tutulum özellikleri hakkında bilgi vererek tedavi planlaması ve malig/benign ayırımında katkı sunar. Bunun yanında radyoizleyici tutulumun görsel ve nicel değerlendirmesi hipertiroidi kliniğine sahip hastalıkların ayırıcı tanısında önemli rol alır (96, 97). Günümüzde tiroid nodülüne yaklaşım ile ilgili kılavuzlarda boyun muayenesinde veya USG'de soliter nodül saptanan ve serum tiroid stimulan hormon (TSH) düzeyi düşük ya da düşük-normal olan hastalarda hiperfonksiyone nodül tespit etmek için radyonüklid görüntülemenin yapılması önerilmektedir. Bu majör endikasyonun dışında TSH düzeyi normal veya normalin üstünde bulunan hastalarda tiroid ultrasonografisi ve biyopsi önerilmekle birlikte tiroid sintigrafisi;

1. Palpabl nodül veya nodüllerin tespit edilmesi,
2. Multinodüler guatrda ince iğne aspirasyon biyopsisinden önce hipoaktif nodüllerin tespit edilmesi,
3. Diffüz hiperfonksiyone tiroid bezinde gizli soğuk nodüllerin tespit edilmesi,
4. Biyopsi sonucu foliküler neoplazm saptanan hastalarda nodül fonksiyonunun belirlenmesi,
5. Biyopsi ile malignite dışlanan ve L-tiroksin tedavisi düşünülen hastalarda nodül fonksiyonunun gösterilmesi,
6. Agenezi, hemiagenezi tespiti,
7. Graves hastalığı ile toksik nodüler guatr ve diğer tirotoksikoz sebeplerinin (tiroidit) ayırıcı tanısında kullanılır.
8. Ayrıca boyun veya üst mediasten yerleşimli ektopik tiroid dokusunun araştırılmasında, cerrahi sonrası rezidü tiroid dokusunun belirlenmesi amacıyla tiroid sintigrafisi uygulanmaktadır (98,99).

2.7.2.2.1. Tiroid Sintigrafisinde Kullanılan Radyofarmasotikler

Tiroid sintigrafisinde en yaygın kullanılan I-123, I-131 ve Tc-99m perteknetatın yanında başka tek foton veya dual foton ajanlarda kullanılmaktadır (Tablo 4) I-131, I-123 ve Tc-99m perteknetat "trapping" olarak adlandırılan aktif transport yöntemi ile tiroid hücresi içine alınırlar. İyot izotopları tiroid peroksidaz tarafından okside edilerek "organifikasyon" olarak adlandırılan işlemle tiroid hormonunun yapısına katılırlar. Tc-99m perteknetat ise organifikasyona katılmaz, trapping'e uğradıktan sonra yavaşça tiroid hücrelerinden dışarı atılır (98).

I-131, nükleer reaktör ürünüdür. Yarı ömrü 8 gündür. Gama bozunmanın yanında beta bozunma da yapar. Radyasyon dozu görece yüksektir. Gama enerjisi 364 keV olup, gamma kameralar için yüksek bir enerjidir. Maksimum beta enerjisi 607 keV 'dir. Dokularda beta enerjisi 2.2 mm'de absorbe edilir. Elde etme ve hazırlama kolaylığı, tiroid dokusu/ background oranının yüksek olması avantajlarıdır. Rutinde tiroid sintigrafisi için kullanılmaz. Gamma ışınları tiroid uptake testi ve diferansiye tiroid kanserlerinin tanısında; beta ışınları ise diferansiye tiroid kanserlerinin ve seçilmiş toksik guatrların tedavisinde kullanılır (101).

Tablo 4. Tiroid görüntülemeye kullanılan diğer radyofarmasötikler

Radyofarmasötik	Endikasyonları
Tc-99m MİBİ	Tiroid nodülleri Tiroid kanseri Medüller tiroid kanseri
Tl-201	Tiroid nodülleri Tiroid kanseri Medüller tiroid kanseri
Tc-99m DMSA	Medüller tiroid kanseri
Ga-67	Lenfoma
I-123 MIBG	Medüller tiroid kanseri tanı ve tedavi
In-111 Octreotid	Medüller tiroid kanseri Lenfoma Hurtle hücreli kanser
F-18 FDG	Tiroid kanseri Medüller tiroid kanseri Hurtle hücreli kanser
Ga-68 DOTATE	Medüller tiroid kanseri

I-123 bir siklotron ürünüdür. 13 saatlik yarı ömrü, 159 keV'lik gamma enerjisi, tiroid dokusu background oranının yüksek olması ve I-131 gibi ideal fizyolojik dağılımı bu radyonüklidi tiroid sintigrafisi için mükemmel bir radyonüklid yapmaktadır fakat pahalı ve dağıtımı zor bir radyonüklid olduğu için rutinde sık kullanılmamaktadır. Retrosternal guatr veya diskordan nodül şüphesi bulunan durumlarda tercih edilir (102).

Tc-99m perteknetat, 6 saatlik kısa yarı ömrü ve 140 keV'lik gamma enerjisi ile gamma kameralar için ideal radyofarmasötiktir. Background aktivitesi yüksektir. Verilen dozun ancak %1-5'i tiroid bezi tarafından tutulur. Kolay elde edilir ve ucuzdur. Rutinde en çok kullanılan radyofarmasötiktir (99).

Çekim öncesi emzirme, hamilelik ve kullanılan ilaçlar sorgulanmalıdır. Emzirenlerde kullanılan RF'ye göre emzirmeye ara verilmelidir. Görüntülemeyi etkileyebileceğinden hasta tiroksin hormonu kullanıyorsa 4-6 hafta; antitiroid ilaç

kullanıyorsa 3-5 gün önceden kesilmelidir. Çekim iyotlu radyofarmosötikler ile yapılacaksa çekim öncesi düşük iyot diyeti uygulanmalıdır. Öncesinde iyotlu kontrast madde ile çekim yapıldıysa sintigrafik görüntüleme 4-6 hafta sonra uygulanmalıdır. Emilimin etkilenmemesi için hasta radyoiyot alımından 3-4 saat önce ve 1 saat sonrasına kadar katı gıda yememelidir. Bu süreçte su içilebilir. Ayrıca sintigrafik görüntülemenin tiroid ince iğne aspirasyon biyopsisinden (TİİAB) önce yapılmasına dikkat edilmelidir. TİİAB yapılmışsa, doku iyileşmesi açısından 1-2 hafta beklenmelidir (97, 99).

2.7.2.2.2. Tiroid Sintigrafisinin Değerlendirilmesi

1- Tüm bezde artmış RF tutulumu:

- Hipertiroidik ise Graves hastalığı
- Hipotiroidik ise endemik guatr, Hashimoto tiroiditi, dishormonogenezis

2- Tüm bezde azalmış RF tutulumu:

- Hipotiroidik ise cerrahi sonrası, I-131 ablasyonu sonrası, Hashimoto tiroiditi
- Ötiroid ise iyot diyetine uyulmaması, iyotlu kontrast kullanımı, ilaç tedavisi (amiodaron, antitiroid-propiltiourasil ve tiroid hormon kullanımı)
- Hipertiroidik ise tiroidit, tirotoksikozis factitia
- Pediatrik ise tiroid agenezisi (en sık), annedeki antikörlere bağlı geçici hipotiroidizm, hafif dishormonogenesis

3- Heterojen RF tutulumu

- Hiper/ötiroid ise toksik/nontoksik multinodüler guatr

4- Fokal artmış RF tutulumu:

- Ötiroid/hipertiroidik ise toksik adenom (sıcak nodül- hiperaktif)

5- Fokal azalmış RF tutulumu:

- Ötiroid/hipertiroidik ise toksik adenom (soğuk nodül - hipoaktif)
- Ötiroid ise kistik nodül, lokal tiroidit, abse olarak yorumlanır (103-107).

Sintigrafide tiroid dışı aktivite tutulumları ise; ektopik tiroid dokusu, tiroglossal kanal kisti, substernal guatr tanıları koymaya yardımcı olur (99).

2.7.2.3. Tc-99m MİBİ Sintigrafisi

Tc-99m MİBİ günümüze miyokard perfüzyon sintigrafisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleer onkoloji kapsamında ise Tc-99m MİBİ, akciğer, meme, tiroit, paratiroit, beyin, melanom, lenfoma, kemik ve yumuşak doku primer ve sekonder tümörlerinin görüntülemesinde kullanılmaktadır. Gastrointestinal ve ürogenital sistem tümörlerinde, Tc-99m MİBİ'nin karaciğer, biliyer sistem ve splanknik bölgedeki fizyolojik uptake'i nedeni ile yaygın kullanım alanı bulamamıştır (108). Tc-99m MİBİ in vivo olarak metabolize olmaz ve 24 saatte %27'si üriner yolla, 48 saatte %37'si fekal yol ile atılır. Hastaya enjekte edilen Tc-99m MİBİ kandan süratli bir şekilde temizlenirken iskelet kaslarında, myokartta, dalakta, tiroide ve tükürük bezlerinde fizyolojik dağılım gösterir. Tc-99m MİBİ'nin büyük bir bölümü hepatobiliyer yolla atıldığından, radioaktivitesinin büyük bir kısmı karaciğer, safra kesesi ve bağırsaklarda izlenir. Bununla birlikte üriner atılımı da olduğu için böbrekler ve mesanede de aktivite birikimi gözlenmektedir. Alınan doz açısından, kritik organ kolondur ve 20 mCi enjeksiyon yapılan hastada 2,7 rad doza maruz kalır. Tüm vücut ise yaklaşık 0,7 rem doza maruz kalmaktadır (109,110). Tc-99m MİBİ, lipofilik ve monovalan katyonik izonitril kompleksidir. Pasif difüzyon ile hücre membranından geçer. Hücre içi negatif transmembran potansiyeli ile mitokondri membranı geçerek mitokondri içinde lokalize olur (111). Dokularda tutulumunda lokal kan akımı, hücre membranındaki elektriksel gradyen farkı, mitokondri sayısı ve metabolizmasındaki artış da etkili olur. Tc-99m MİBİ, iyi görüntü kalitesi, kısa yarı ömrü, uygun radyoaktif doz kullanımı olan bir radyofarmosotiktir. Tc-99m MİBİ, hem erken (10-30 dakika) hem de geç görüntüler (60-120. dakika) alınmasına imkân sağlar. Tc99m MİBİ, tümörlerde, multidrug rezistans mekanizması ile ilişkili P-glikoprotein fonksiyonunun ve inhibisyonunun in-vi-vo olarak saptanmasında araştırılan bir ajandır. MDR1 Pgp MİBİ nin tümör hücrelerinde tutulumunu etkileyen faktördür. Dolayısıyla bu özelliği tiroid nodüllerinin benign-malign ayrımında tercih edilen bir ajandır. Literatürde hipofonksiyone ve MİBİ tutulumu gösteren nodüllerde malignite olasılığının arttığını, tutulum olmayan nodüllerin de genellikle benign olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Aynı amaçla yapılan başka bir çalışmada, Tc-99m MİBİ ile tutulum gösteren nodüllerin %35' inde malignite tespit edilmiştir (112, 113).

Saggiorato ve ark. Indetermine sitolojik tanısı olan nodüllerini preoperatif olarak malign davranışlarına göre değerlendirmek amacıyla görsel ve Tc-99m MİBİ ile semikantitatif analiz yöntemini karşılaştırmışlar; foliküler onkositik neoplazm sitolojisi olanlarda MİBİ'nin kullanımı sınırlı olmakla birlikte, non-onkositik foliküler neoplazmlardaki MİBİ taramalarının tanısallığını doğruluğunu %94,44 olarak bulmuşlardır. Semikantitatif analizin görsel değerlendirmeye göre sensitivite ve spesifitesinin sırasıyla (%100, %73,33 ve %90,48, %80,95) daha iyi olduğunu tespit etmişler ayrıca Tc-99m MİBİ görüntüleri ile multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) ve MDR1 gene coded P-glycoprotein (P.gp) arasındaki ilişkiyi analiz etmişler; sintigrafik bulgular ile MDR1-P-gp geninin immünohistokimyasal ekspresyonu arasında iyi bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Tc-99m MİBİ 'nin MDR1 gen kodlu-P-gp ve MRP1 için bir substrat olduğunu ve tiroid nodüllerindeki MİBİ tutulumundan sorumlu moleküler mekanizmalar hakkında bilgi sağladığını tespit etmişlerdir (114). Giovanella ve ark. tiroid nodülü olan ve sitolojik olarak foliküler neoplazm tanısı alan 61 hastada, genetik mutasyon analizi ile görsel ve semikantitatif Tc-99m MİBİ sintigrafisini karşılaştırmışlardır. MİBİ'nin görsel analiz için sensitivitesi, spesifitesi, doğruluğu, PPD ve NPD'i sırayla %73, %81,%78, %73 ve %81 iken; semikantitatif analiz için %100, %90, %95, %88 ve %100 olarak bulmuşlardır. Yazarlar Semikantitatif analiz yönteminin, differansiye tiroid kanserleri ile ilişkili mutasyon varlığını gösteren testlerden ve Tc-99m MİBİ sintigrafisinin vizüel değeri üstün olduğunu ve benign -malign nodül ayırımında tercih edilebilecek bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir (115). Benzer bir çalışmada, Tc-99m perteknetat sintigrafisinde soğuk nodülü ve Bethesda sınıflanmasına göre indetermine nodülü olan 105 hastanın dahil edildiği çalışmada, MİBİ semikantitatif analizinin sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %100 ve %90,9 olarak bildirilmiştir (116). Yazarlar bulguları doğrultusunda indetermine sitolojiye sahip hastalar da semikantitatif MİBİ sintigrafisinin kullanılmasının malign lezyonların daha iyi belirlenmesi ile operasyona yönlendirilecek hasta sayısını azalmasını sağlayacağını savunmuşlardır. Literatürde malign nodül tespitinde, Tc-99m MİBİ görüntüleme ile F-18 FDG PET'in performansını karşılaştıran birkaç çalışma mevcuttur. Tc-99m MİBİ ile tutulum gösteren nodüllerin %35' inde malignite tespit edilmiş bu oran F-18 FDG tutulumu ile benzerlik göstermiştir (117). Sager ve ark.'ları soğuk tiroid nodülü olan hastaları preoperatif değerlendirmiş; F-

18 FDG PET'in benign-malign nodül ayırımında Tm MİBİ'den üstün olmadığını göstermişlerdir. Düşük maliyeti ve bulunabilirliği nedeniyle TİİAB'ne ek bir işlem olarak MİBİ taramasının ilk seçenek olmasını önermişlerdir (118). Diferansiye tiroid malignitelerinin ve medüller tiroid kanserinin MİBİ tutulumunun olduğunu gösterdiği raporlarla birlikte etkinliği hakkında yayınlanmış veriler yetersizdir (119).

2.7.2.3. Diğer Görüntülemeler

Bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntülemenin tiroid nodüllerin rutin tanı ve takibinde yeri olmamakla birlikte preoperatif dönemde tiroid kanserine bağlı lenf nodu metastazlarının belirlenmesi, cerrahi öncesi invaziv hastalık değerlendirilmesi ve postoperatif dönemde boyunda rekürrenslerin saptanmasında ultrasonografiye yardımcı olarak kullanılmaktadırlar (88).

2.7.3. Tiroid Sitopatolojisi

Bethesda tiroid sitopatolojisi raporlama sistemi, tiroid ince iğne aspirasyon örnekleri için belirli tanı kategorisine sahip standart bir raporlama sistemi oluşturmak için tasarlanmıştır. Sitopatologlar Bethesda Sistemi'ni kullanarak yorumlarını kısa, net ve klinik olarak faydalı terimlerle ifade edebilirler (120, 121). Bethesda altı genel kategoriye ayrılmıştır. Bazı kategorilerin iki alternatif adı vardır. Bir laboratuvar bunlardan tercih ettiğini seçmeli ve o kategori için sadece onu kullanmalıdır. Eşanlamlı terimler (örneğin, AUS ve FLUS) iki farklı yorumu belirtmek için kullanılmamalıdır. Tablo 5'te gösterildiği gibi kategorilerin her biri, kanıta dayalı bir kanser riski referansıdır (122). Tabloda 2010'dan bu yana elde edilen verilere dayanarak revize edilmiş olup malignite riskleri gösterilmektedir. 2017 sınıflamasına göre, NIFTP tiroid karsinomları listesinden çıkarıldığı için malignite risk yüzdeleri değişmiştir (Sağdaki sütun 2017 öncesi sınıflamaya göre, soldaki sütun 2017 sonrası sınıflamaya göre kanser riski yüzdelerini göstermektedir) (123).

I. Tanısal Olmayan veya Yetersiz

- Sadece kist sıvısı
- Neredeyse hücresiz örnek
- Diğer (pıhtılaşma artefaktı vb.)

II. Benign

- İyi huylu bir foliküler nodül ile uyumlu (adenomatoid nodül, kolloid nodül vb.)
- Lenfositik (Hashimoto) tiroidit ile uyumlu
- Granülomatöz (subakut) tiroidit ile uyumlu
- Diğer

III. Önemi Belirlenemeyen Sitolojik Atipi/Foliküler Lezyon (AUS/FLUS)

IV. Folliküler Neoplazm veya Folliküler neoplazm Şüphesi

- Hurthle hücre (onkositik)

V. Malignite Şüphesi

- Papiller karsinom şüphesi
- Medüller karsinom şüphesi
- Metastatik karsinom için şüpheli
- Lenfoma için şüpheli
- Diğer

VI. Malign

- Papiller tiroid karsinomu
- Kötü diferansiye karsinom
- Medüller tiroid karsinomu
- Anaplastik karsinom
- Skuamöz hücreli karsinom
- Karışık özelliklere sahip karsinom
- Metastatik karsinom
- Non Hodgkin lenfoma
- Diğer (123)

Tablo 5. Bethesda sistemine göre malignite risk yüzdeleri ve önerilen tedavi takip planı

Kategori	Malignite riski % NIFTP ≠ CA (%)	Malignite riski % NIFTP = CA (%)	Tedavi
Nondiagnostik	5–10	5–10	TİİAB tekrarı
Benign	0–3	0–3	Klinik ve sonografik takip
AUS/FLUS	6–18	~10–30	TİİAB tekrarı, moleküler test veya lobektomi
FN veya FN şüphesi	10–40	25–40	Moleküler test veya lobektomi
Malignite şüphesi	45–60	50–75	Total tiroidektomi veya lobektomi
Malign	94–96	97–99	Total tiroidektomi

2.8. Cell Free DNA

Hücrelerden dolaşım sistemine salınan cell free DNA (cfDNA) kanser yönetiminde çeşitli alanlarda uygulanmaktadır. İlk olarak 1948 yılında Mandel ve Métais tarafından keşfedilmiştir. cfDNA dolaşımında yüksek oranda fragmente olarak bulunur ve yarı ömrü kısadır (125). Sağlıklı kişilerde cfDNA seviyeleri nispeten düşüktür ve normal hematopoietik hücrelerin ya da diğer çekirdekli hücrelerin apoptozundan kaynaklandığı düşünülmektedir (124). Bunun dışında lenfositler ve diğer birçok canlı hücre yeni sentezlenmiş DNA'yı kendiliğinden serbest bırakabilir. cfDNA çoğunlukla patolojik mekanizmalar tarafından dolaşıma salınır. İnme, travma, miyokard enfarktüsü, sistemik lupus eritematozus ve çeşitli kanser türleri gibi birçok hastalık durumu olan hastaların plazmasında veya serumunda yüksek cfDNA konsantrasyonları rapor edilmiş olup cfDNA'nın salınımı proinflamatuvar bir sitokin yanıtını aktive ediyor gibi görünmektedir (124).

Dolaşımdaki cfDNA uygulamasının en iyi başarıyı elde ettiği ve bugüne kadar yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri de doğum öncesi genetik testlerdir. 2011 yılında noninvaziv prenatal testler (NIPT) klinik uygulamada kullanılmaya başlandı. Hamilelik sırasında anne plazmasında fetal kaynaklı nükleik asitlerin

tanımlanması ilk kez 1997'de rapor edilmiştir. Maternal plazma cfDNA, hem maternal hem de fetal DNA'nın bir karışımından oluşur, burada fetal fraksiyon toplamın sadece küçük bir yüzdesine katkıda bulunur ve gestasyonel yaş ile artar. Fetal kaynaklı cfDNA, 4-5 haftalık gebelikten tespit edilebilir ve doğumdan sonra anne dolaşımından hızla temizlenir, bu da gebeliğe özgü olduğunu düşündürür. İlk çalışmalarda babadan kalıtılan veya de novo mutasyonlar gibi anne genomunda olmayan ve fetüste bulunan alellerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir; bu yaklaşımlar, fetal cinsiyet değerlendirmesini ve akondroplazi, miyotonik distrofi gibi otozomal dominant ya da paternal şekilde kalıtılan tek gen bozukluklarının saptanmasını içermekteydi. Teknolojideki sürekli gelişmeler sayesinde bakış açısı hızla değişmiş ve fetal cfDNA uygulamaları doğum öncesi tanıda çok fazla avantaj sağlar hale gelmiştir (126). Şu anda, cinsiyet belirleme, RhD ve fetal kan grubu sistemi genotipleme, güvenilirlikleri ve yüksek doğrulukları nedeniyle birçok ülkede klinik uygulamada kullanılmaktadır. Ek olarak, trizomi, cinsiyet kromozomu anöploidileri ve spesifik mikrodelsyonlar dahil olmak üzere fetal anöploidilerin doğum öncesi teşhisi için cfDNA teknolojisi kullanılmaktadır (126).

Güçlü bir tarama aracı olarak kabul edilse bile, cfDNA'nın birkaç sınırlaması vardır. Anöploidilerin saptanmasında, karyotiplemenin alternatifi olarak kabul edilemez; cfDNA'nın anöploidi tespiti en yaygın trizomilerle sınırlıdır. Ayrıca, tek gen bozuklukları, otozomal resesif ve X'e bağlı hastalıkların teşhisi için cfDNA'nın kullanımı, henüz rutin olmayan gelişen bir teknolojidir (127). cfDNA plazmada ve beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı, idrar gibi vücut sıvılarında bulunabilir. Çalışmalar, plazma cfDNA moleküllerinin çoğunun sağlıklı bireylerde hematopoietik sistemden kaynaklandığını göstermiştir. Bununla birlikte, hamilelik, organ nakli ve kanserler gibi belirli fizyolojik veya patolojik durumlarda, ilgili/etkilenen dokular, periferik dolaşıma ek DNA salabilir. Bu nedenle, periferik kanda cfDNA'nın tespiti, bireylerin anormalliklerini invaziv olmayan bir şekilde tanımlayabilir. Son yıllarda, NIPT, organ naklinin izlenmesi ve immün hastalıkları tespit etme ve kanser tanıları için cfDNA analizine dayanan çeşitli teknolojiler bulunmuştur (124).

Protein biyobelirteçlerinin ve nükleik asitlerin analizi, kanser teşhisi, kanser risk sınıflandırması ve moleküler hedef ajanları için popüler hale gelmiştir. cfDNA

analizi, kolay erişilebilirliği, invaziv olmayan yapısı ve kantitatif tespit veya spesifik sekanslama yoluyla potansiyel tümör spesifikliği nedeniyle ilgi çekmektedir. Bu nedenle, klinik kanser yönetiminde cfDNA'nın potansiyel uygulamasını araştırmak için önemli çabalar sarf edilmiştir. Moleküler biyoloji ve yeni nesil dizileme yaklaşımlarının ilerlemesi nedeniyle cfDNA analitik teknolojilerinin duyarlılığı büyük ölçüde iyileştirilmiştir. cfDNA analizi, kanser teşhisi ve prognoz tahmininin yanı sıra kanser ilacı direnci ve erken taramanın çeşitli alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (125).

Kanser hastaları, hücresel nekroz veya apoptozun bir sonucu olarak serum veya plazmalarında genellikle yüksek düzeyde cfDNA'ya sahiptir, çünkü tümör hücreleri normal hücrelerden daha hızlı bölünür ve cfDNA'lar yüksek oranda salınmaktadır. Tümör hücrelerinden türetilen cfDNA fraksiyonu, dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) olarak adlandırılır. Son yıllarda hem cfDNA hem de ctDNA, cfDNA'nın kantifikasyonu, kinetik analizi ve ctDNA'nın moleküler profilini ve prognostik değerlerini öngördüğü için yeni kan biyobelirteçleri olarak büyük ilgi görmektedir. Kansere özgü mutasyonların tanımlanması için tasarlanmış birkaç likit biyopsi testi, Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından tedaviye karar vermede rehberlik etmesi için ek tanı testleri olarak önerilmiştir. Bu tür testler, küçük olmayan akciğer kanseri için cobas EGFR Mutasyon Testi'ni, meme ve over kanseri için BRAC Analizi'ni içerir. SEPT9 geni metilasyonu analizlerine dayanan Epi proColon®, kolorektal kanserin saptanması için FDA onaylı ilk ve tek kan bazlı testtir (128).

cfDNA, en yaygın olarak hücre ölümü sonucunda hücreler tarafından dolaşıma salınan parçalanmış DNA'dan gelir. Sağlıklı bireylerde, kan cfDNA'sı, normal hücreler tarafından salınan germline DNA'sından kaynaklanır. Kanser hastalarında cfDNA'nın bir kısmı, mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genler veya onkogenler ve DNA metilasyonu gibi hastanın tümörüne karşılık gelen tümöre özgü varyasyonları içerebilen dolaşımdaki tümör DNA'sı olarak adlandırılan tümör hücrelerinden gelir. Bazı kantitatif çalışmalara dayanarak, sağlıklı deneklerde cfDNA konsantrasyonunun 0 ile 100 ng/ml arasında olduğu ve ortalama 30 ng/ml olduğu, buna karşın kanser hastalarının kanındaki cfDNA

konsantrasyonunun 0 ile 1000 ng/ml arasında değiştiği, ortamasının 180 ng/ml olduğu bulunmuştur (124).

Tümörlerin boyutu ve evresinin, ctDNA'nın kan düzeyi ile korele olduğu bildirilmektedir. Evre IV veya ilerlemiş tümörleri olan hastalarda 5 mL kan başına 100-1.000 kopya ctDNA mevcut iken erken evre kanserli hastalarda sadece 10 kopya ctDNA vardır. Metastatik tümörlü hastalarda daha da fazla miktarda ctDNA görülür (129).

2.8.1. cfDNA'nın Kullanıldığı Alanlar

Kan cfDNA düzeyi, hemopoetik kanserli hastalar için önemli bir noninvaziv tanı aracı olarak hizmet edebilir. Salvianti ve ark. 180/67 DNA bütünlük indeksini değerlendirmek için farklı uzunluklarda (67 ve 180 bp) iki amplikonun sayımına dayanan nicel bir gerçek zamanlı PCR yaklaşımını benimsemiştir. CfDNA bütünlük indeksi 180/67'nin tiroid kanserinde cfDNA parçalanmasını monitorize edebildiğini bildirdiler (130). Böylece, cfDNA bütünlük indeksi 180/67, tiroid nodüllerinin teşhisi için dolaşımdaki bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Nodüler tiroid hastalıklarından etkilenen hastalarda cfDNA miktarı sağlıklı bireylere göre daha yüksektir. Sitolojik olarak teşhis edilen tiroid karsinomu olan hastalarda cfDNA bütünlük indeksi, benign nodülleri olan bireylere göre daha yüksek bulunmuştur. CfDNA bütünlük indeksi, tiroid kanserinde Bethesda sınıflandırması ve histopatolojisi ile korele olan yararlı bir noninvaziv moleküler biyobelirteç olarak bulunmuştur. Ayrıca papiller ve foliküler tiroid kanserinde tümör boyutu ve kapsüler invazyon cfDNA sayısı ile ilişkilidir (131).

KRAS mutasyonunun cfDNA kullanılarak tanımlanabileceği bildirilmektedir. KRAS mutasyonları, sağlıklı deneklerin cfDNA'sında bulunmaz. Wang ve ark. evre I-IV kolorektal kanserli hastalarda KRAS mutasyonlarını (12, 13 ve 61 kodonlarında) ortaya çıkardı ve bu mutasyonları kan örneklerinde buldu. Kolorektal kanserli tümör dokuları ve cfDNA arasında yaklaşık %45 uyum olduğunu gösterdiler (132).

CDH1, PIK3CA, ARID1A, EGFR ve PTEN gibi genlerdeki mutasyonların mide kanserinde var olduğu ve mide kanserinin saptanması için dolaşımdaki DNA'yı sağladığı biliniyordu. Dolaşımdaki 5 hmC (5-Hydroxymethylcytosine) cfDNA'nın mide kanseri hastalarını sağlıklı deneklerden spesifik ve hassas bir şekilde ayırabileceği bildirildi (124).

DNA metilasyonu, protoonkogenlerin etkinleştirilmesinde veya tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesinde rol oynar. Kan cfDNA'sındaki RASSF1A promotor hipermetilasyonunun hepatosellüler karsinomun (HCC) boyutu ile korele olduğu ortaya koyuldu. Kandaki cfDNA'da RASSF1A promotor metilasyonunun tespiti HCC hastalarında %90 ve sağlıklı deneklerde sadece %10'dur. HCC hastalarında metillenmiş RASSF1A'nın ortalama kan seviyesi, sağlıklı bireylerdekenden önemli ölçüde yüksektir (133).

Cell free DNA analizi, hastalıkları klinik bulgular başlamadan önce taramak için kullanılmıştır. cfDNA analizinin, Epstein-Barr virüsünün (EBV) neden olduğu asemptomatik erken evre nazofaringeal karsinomu taramanın etkili bir yolu olduğunu göstermiştir. Kanda EBV DNA için 20.000'in üzerine asemptomatik deneğin taranmasını içeren bir çalışmada, 34 kişide nazofaringeal karsinom teşhisine katkı sağlamıştır. İnsan papilloma virüsünün (HPV) dolaşımdaki cfDNA'sı, serviks kanseri de dahil olmak üzere HPV ile ilişkili maligniteler için benzersiz bir tümör biyobelirteç olarak kullanılabilir (134).

HCC, kolorektal, prostat, akciğer, serviks, meme, mesane, pankreas, özefagus kanserlerinde hastalık ilerlemesinin izlenmesinde ve tedavi yanıtının öngörülmesinde cfDNA kullanılabilir. Meme, HCC, pankreas, akciğer, oral SCC, kolorektal, melanom, prostat kanserlerinde cfDNA prognostik biomarker olarak kullanılabilir (124).

2.9. Likit Biyopsi

Kanserin prognozu, büyük ölçüde, saptanabilir bir birincil tümörün incelenmesi veya vücuttaki diğer bölgelere göç eden yayılmış kanser hücrelerinin kolonizasyonu ile ilişkilidir. Klinik olarak saptanabilir metastazların ortaya çıkması, kanserin başlangıcından sonra yıllar alabilir ve bu gözlemlenen uyku halinin altında yatan mekanizma bilinmemektedir. Kanser tedavisinin gidişatını değiştiren yeni ortaya çıkan hedefli tedavilere rağmen, ilişkili tümör heterojenliği ve klonal seçim bu tür tedavilere karşı tümör direnci ile sonuçlanır. Hedefli tedavilerin etkinliğinin kanser alt tiplerine özgü olması nedeniyle, hasta üzerindeki tedavi etkilerini optimum yapmak için uygun kanser alt sınıflandırmasının yapılması zorunludur. Örneğin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri durumunda, folat inhibitörünün adenokarsinomların ve kötü diferansiye küçük hücreli olmayan karsinomların tedavisinde etkili olduğu, ancak skuamöz hücreli karsinomlar için etkisiz olduğu bildirilmiştir (135).

Bu nedenle, kanserin spesifik alt tiplmesi, tedavi sırasında spesifik hedef ajanların seçimini etkiler. Kanser alt tiplmesinin altın standardı olarak kabul edilen tümör dokusu biyopsisi, lezyonun yalnızca sınırlı bir bölgesi hakkında bilgi sağlar ve bazı durumlarda elde edilmesi oldukça zordur. İmmünohistokimyasal tümör analizi sırasında kısmi örnekleme ve spesifik olmayan bulgular, hastaların tanısında tutarsızlıklar gösterir ve daha sonra etkisiz tedavi ile sonuçlanır. Ayrıca hastanın çoklu biyopsi prosedürleri sırasında ağrıya dayanmasını gerektirir. Bu amaçla, kanser araştırmalarında ve biyomedikal teknolojide yapılan ilerlemeler, likit biyopsi olarak bilinen vücut sıvılarının noninvaziv örneklenmesi yoluyla geleneksel biyopsileri tamamlamak için yeni tanı araçlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (136).

Hematolojik olmayan kanserler hakkında bilgi edinme yeteneği, kanser teşhisinde büyük ilerlemeler sağlayan en heyecan verici atılımlardan biri olmuştur. Hastanın durumu hakkında gerçek zamanlı bir feedback sağlamayı vaat eden likit biyopsi ile birlikte kritik biyobelirteçlerin sistematik ve rutin ölçümlerine dayanan hücresel ve moleküler terapötiklerin uygulanabilirliğini kesinlikle artırmıştır (137).

Bu biyobelirteçler, dolaşımdaki tümör hücreleri (CTCs= circulating tumor cells), dolaşan tümör DNA'sı (ctDNA= circulating tumor DNA) ve mikroRNA içeren hücre dışı veziküller (EVs = extracellular vesicles) gibi tümör kaynaklı maddeleri içerir ve birincil tümör içindeki hücrelerden salınan ve metastazda önemli roller oynadığına inanılan atık ürünler olarak kabul edilir (138,139). CTC'lerin, birincil ve metastatik tümör kitlelerinden kan dolaşımına ayrılan hücreler olduğuna inanılmaktadır. CTC'lerin metastatik hücre popülasyonu içerdiğine ve tümör içi heterojenite ve klonal evrim dahil olmak üzere tümör özelliklerini temsil ettiğine inanılmaktadır. Ancak bu nadir hücrelerin teşhis ve prognostik potansiyeli, ancak gerekli sensitivite ve spesifiteye sahip teknolojilerin geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, CTC izolasyonunun önceki yaklaşımları, basit filtrasyon ve sedimantasyon tekniklerinin kullanımını içermekteydi. Sonuç olarak, CTC'ler ve ctDNA, likit biyopsi teşhisinin özünü oluşturur ve kanser tedavisi ve yönetiminde yeni yollara giden yolu açar. Likit biyopsi, primer tümörlerin biyopsisinin zor olduğu durumlarda etkili alternatifler olarak hizmet edebilir. (136, 140) Ayrıca, likit biyopsi, hastaları sınıflandırmaya ve tarama modalitelerini daha yüksek riskli popülasyona odaklamaya yardımcı olabilir, böylece yan etkileri (örneğin mamografide radyasyon) ve sağlık bakım maliyetlerini azaltabilir. Bununla birlikte, sensitivitesi ve spesifitesi düşük olan erken tanı belirteçleri yerine sistemik tedavi sırasında CTC'leri ve ctDNA'yı kullanmak daha uygun olabilir. Bu bağlamda, ctDNA ve CTC'lerin hedefe yönelik tedavilere verdiği yanıtın analizleri, klinik uygulamaya yönelik fizibiliteyi artırabilir (141). Ekstrasellüler veziküller ve ctDNA'lar, CTC'lerden daha bol ve analiz edilmesi daha uygun görünse de teknik zorluklar barındırmaktadır. Ekstrasellüler veziküllerin, ctDNA'ların ve CTC'lerin arkasındaki biyolojiye ilişkin daha derin kavrayışlar, hastanın moleküler profilleri ile fizyolojik hastalık durumu arasında korelasyon kurabilir (142). Bu üç likit biyopsi biyobelirteçlerinin her birinin avantajlarının yanı sıra sınırlamaları da vardır. Etkili kanser teşhisi ve yönetimi, heterojenlik ve biyobelirteç seviyelerindeki çeşitlilik nedeniyle sonuçsuz olduğu kanıtlanan tek biyobelirteç tabanlı analize güvenmek yerine, tüm bu likit biyopsi biyobelirteç numunesinin eşzamanlı analizine doğru ilerleyebilir (143).

2.10. Telomer, Telomeraz ve Kanser

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarındaki TTAGGG nükleotitlerinin tekrarlarıdır. Uzun zamandır kromozom bütünlüğünü ve genomik stabiliteyi korudukları bilinmektedir. Telomer onarımı normalde telomeraz aktivitesi ve hücre döngüsü boyunca doku ve hücre tipine özgü şekillerde telomerazla ilişkili faktörler tarafından kontrol edilir (144, 145). Beyaz kan hücrelerinde telomer uzunluğunun yaşla ters orantılı olduğu iyi bilinmektedir, bu da telomer uzunluğunun bir hücrenin ve bir organizmanın ömrünü belirlemek için biyolojik bir saat görevi görebileceğini düşündürmektedir (146). Telomerik DNA'nın aşırı kısalması veya telomer bağlayıcı protein fonksiyonunun kaybı nedeniyle telomer onarımı bozulduğunda, işlevsiz telomeri onarmak için hücresel DNA hasar yanıtı aktive olur (147). Kalıcı DNA hasar yanıtı, bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür ve çoğalmanın kalıcı olarak durmasına neden olur, böylece hücresel yaşlanma ve apoptoz indüklenir. (148). Bununla birlikte, DNA hasar yanıtı yolunda meydana gelen bir düzensizlik, hücrelerin yaşlanma sınırlarının ötesinde çoğalmasına izin verir. Hücreler kalıcı bir telomer disfonksiyonu (telomer krizi olarak adlandırılır) aşamasına ulaştığında, bu anormal süreçler kırılma-füzyon-köprü döngüleri yoluyla genomik kararsızlığa neden olan telomer füzyonlarına yol açar. Sonuç olarak, devam eden genomik kararsızlık, neoplastik dönüşümü destekleyecek başka genetik veya epigenetik değişikliklerin oluşumunu artırabilir. Bu nedenle, yaygın telomer erozyonu, kromozomal füzyon ve genomik rearanjmanlar (yeniden düzenlemeler) ile karakterize edilen telomer krizi, kanser gelişiminde önemli bir etken olarak görülmektedir (149).

Telomeraz, guanin açısından zengin zincire telomerik tekrarlar ekleyerek telomer kısalmasına karşı koyan bir reverse transkriptaz enzimidir. Bir telomeraz RNA bileşeni ve bir protein bileşeni olan telomeraz ters transkriptazdan oluşur. Telomeraz yokluğunda veya enzimin aktivitesi replikatif erozyona göre düşük olduğunda apoptoz tetiklenir (150). Telomeraz iki alt birimden oluşur: 1) RNA bileşeni, telomeraz RNA; DNA'ya telomer heksamer tekrar eklenmesi için bir şablon görevi görür; 2) Katalitik bileşen, telomeraz ters transkriptaz (TERT); heksamer tekrarlarının kromozom uçlarına reverse transkripsiyonundan

sorumludur. Telomeraz sadece embriyonik ve kök hücrelerde aktif kalmakla kalmaz, aynı zamanda tiroid kanseri de dahil olmak üzere malignitelerin %90'ından fazlasında upregüle olur ve kanser hücrelerinin sınırsız replikasyonunu sağlar (151). Kanserde TERT aktivasyonu çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir. Bunlar, aktive edici promotör mutasyonlarını, promotör DNA metilasyonundaki değişiklikleri, kromatin remodelingini, kopya sayısı değişikliklerini ve TERT'nin alternatif splicingini içerir. Telomeraz karsinogenezde anahtar bir rol oynadığından, tiroid kanserinde TERT düzenlemesini ve telomeraz aktivasyonunu anlamak, patogenezini anlamak için kritik öneme sahiptir. Gerçekten de iki TERT düzenleyici mekanizma, TERT promotör mutasyonları ve TERT promotör metilasyon durumu, tiroid kanseri hasta prognozunun sınıflandırılmasında rol oynar (152). TERT promotöründeki aktive edici nokta mutasyonları, TERT transkripsiyonunu belirgin şekilde aktive eder ve tiroid kanserinde kanserli dokularda saptanan epigenetik değişikliklerle ilişkilidir. Bu epigenetik değişiklikler, promotör metilasyon kalıplarını ve histon kuyruğu metilasyon modifikasyonlarını içerir. Ayrıca, TERT lokusunun birden fazla kromozomal kopyaya sahip olduğu veya kanserde artmış TERT transkripsiyonuyla birlikte amplifiye olduğu bulunmuştur. Transkripsiyon sonrası, TERT transkripti, aktif izoform olan tam uzunluktaki transkripti veya düzenleyici fonksiyonlara sahip olabilecek diğer aktif olmayan izoformları oluşturmak için alternatif splicinge tabi tutulur. TERT transkripsiyonunun aktivasyonu, TERT promotöründe heterozigot nokta mutasyonları ile sağlanabilir. En yaygın iki aktive edici mutasyon, sırasıyla -124 ve -146'da TERT translasyon başlangıç bölgesinin upstreamidir ve her ikisi de sitozin ile timin mutasyonlarıdır (-124C>T ve -146 C>T). Bu TERT promotör mutasyonları, iyi huylu tiroid tümörlerinde veya normal tiroid hücrelerinde mevcut değildir. Bununla birlikte prevalansları, daha agresif tiroid kanseri alt tipleri ve hastalığın ileri evreleri ile artar. TERT mutasyonları, iyi diferansiye papiller tiroid kanserinin yalnızca %11,3'ünde ve foliküler tiroid kanserinin %17,1'inde mevcuttur, ancak yaygın invaziv Hurthle hücreli karsinomun %32'sinde, kötü diferansiye tiroid kanserinin %43,2'sinde ve anaplastik tiroid kanserinin %40,1'inde mevcuttur (154). TERT promotör mutasyonları, CpG promotör metilasyonu, histon kuyruk modifikasyonları, kopya sayısı amplifikasyonları ve alternatif splicing yollarıyla gerçekleşir (153). Bir TERT mutasyonunun varlığı aynı zamanda yüksek tümör nüksü riski, ileri yaş, daha

yüksek MACIS (Metastaz, hasta yaşı, rezeksiyonun tamlığı, lokal invazyon ve tümör boyutu) skorları ve daha az diferansiye papiller tiroid kanseri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. (155). Anaplastik karsinomun, papiller karsinom ile birlikte bulunduğu tiroid kanserleri üzerine yapılan geniş bir çalışmada, anaplastik transformasyon olmaksızın önceki papiller karsinom bileşenleri ile kontrol papiller karsinomlar arasında çok değişkenli bir karşılaştırma, TERT mutasyonlarının bağımsız olarak anaplastik transformasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (156). Her iki TERT promotör mutasyonu (-124C>T ve -146 C>T), E-twenty-six (ETS) transkripsiyon faktörü ailesi için yeni bir 11 baz çifti bağlama bölgesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, -124C>T mutasyonu, -146C>T mutasyonuna kıyasla daha yüksek bir TERT aktivasyonu ortaya çıkarır ve daha yaygındır (157). ETS ailesinin bir üyesi olan aktive edici GA Bağlayıcı Protein Transkripsiyon Faktörü Alt Birimi Alfa (GABPA), tiroid kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde, TERT promotör mutasyon bölgesinde muadili GABPB ile bir heterotetramer olarak bağlanır. Papiller tiroid kanseri hücre dizilerinde, GABPA yıkımının TERT ekspresyonunu önemli ölçüde düşürdüğü bulunmuştur (158). Özetle, TERT çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenir. Malignitelerin çoğu devam eden proliferasyona izin vermek için telomerazı aktive eden TERT ekspresyonunu reaktif eder. TERT reaktivasyonu kanser hücreleri için önemlidir, kanser hücreleri önemli ölçüde daha kısa telomerlere sahiptir (159). Normal tiroid dokusu ve benign tiroid nodüllerine kıyasla PTK, FTK, hürtle hücreli karsinom ve medüller tiroid kanserinde kısaltılmış telomerler bulunur. PTK tümörlerinde kısa telomerler, TERT promotör mutasyonları ve ileri yaş ile önemli ölçüde ilişkilidir (160). Bununla birlikte, TERT promotör mutasyonunun varlığı, klinik karar verme ve tedaviyi yönlendirmek için gelecekte kullanım için umut verici olabilir. TERT promotör mutasyonunun varlığı, tiroid kanserinde daha kötü klinikopatolojik faktörlerin göstergesidir. Tiroid araştırma alanı, son zamanlarda klinik kararların alınmasına yardımcı olmak için moleküler belirteçlerin kullanımını benimsemeye başlamıştır. Örneğin, malign potansiyeli belirsiz foliküler tümörlerde TERT promotör mutasyonu için ameliyat sonrası tarama, takip ve tedaviyi yönlendirebilir. Çünkü TERT mutasyonu uzak metastazların öngörücü bir belirteçidir (153).

Yetişkinlerde Tiroid Hastalığının Kesin Cerrahi Tedavisi için yeni Amerikan Endokrin Cerrahlar Birliği Kılavuzunda, tiroid kanserlerinde genel mutasyon yükünün değerlendirilmesinde TERT promotör mutasyonunun dahil edildiği kabul edilmektedir. Tiroid Nodülleri ve Diferansiye Tiroid Kanseri Olan Yetişkin Hastalar için 2015 Amerikan Tiroid Birliği Yönetim Kılavuzları, TERT'yi tek başına veya BRAF ile kombinasyon halinde, diğer klinikopatolojik risk faktörleriyle birlikte hastaları risk sınıflandırmasına yardımcı olabilecek potansiyel olarak listelemiştir (161,162). TERT eklemesinin nasıl düzenlendiğini anlamak, telomeraz aktivasyonunun daha iyi anlaşılması için esastır. TERT promotör metilasyonunun ve ayrıca spesifik tiroid kanseri alt tiplerinde, ETS transkripsiyonel aktivatör bağlanmasının karakterizasyonu, bu ölümcül hastalıklar için potansiyel tedavi seçeneklerine yol açabilir (153).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik izin

Tez projemiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 'nun 12/03/2020 tarih ve 04-01 sayılı kararı ile etik onay almış (Ek 1) ve 2022 yılı 2/16 sayılı Fakülte Yönetim Kurulunda uygun görülerek uygulanmıştır. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TTU-2020-3369 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

3.2. Örneklem Seçimi ve Çalışmaya Alım Ölçütleri

Çalışmaya Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp kliniğinde malignite şüphesi nedeniyle Tc-99m MİBİ tiroid-tümör tarama sintigrafisi çekilen, Endokrinoloji polikliniğinde tiroid ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılan ve Tıbbi Genetik laboratuvarında kan, plazma ve biyopsi materyallerinde cfDNA ve telomer uzunlukları ölçülen 128 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların tamamında sintigrafi ve biyopsi yapılırken 98 tanesinde telomer uzunlukları ölçülmüştür. Tiroid biyopsi sonucu yetersiz materyal olarak değerlendirilen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Bu çalışmaya katılan tüm kişiler, kan ve biyopsi örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve imzalı onam formu elde edildikten sonra çalışmaya dahil edilmişlerdir.

3.3. Hasta Gruplarının Oluşturulması

Gruplar oluşturulurken Bethesda sınıflaması dikkate alındı. Bethesda sınıf I (Tanısal Olmayan veya Yetersiz) tanısı alan hastalar çalışmamız için dışlama kriteri kabul edildi ve çalışmaya alınmadı. Bethesda sınıf II (Benign), benign grup olarak, Bethesda sınıf III (AUS, FL-US), IV (Foliküler Neoplazi veya Şüphesi), V (Malignite Şüphesi) olanlar şüpheli grup olarak, Bethesda sınıf VI (malign) olanlar malign grup olarak gruplandırıldı.

3.4. Tc-99m MİBİ Sintigrafisi

Kliniğimize tiroid malignitesi şüphesi ile yönlendirilen 128 hastaya Tc-99m MİBİ tümör tarama sintigrafisi çekildi. Tc-99m MİBİ tümör tarama sintigrafisi çift başlı gama kamera sistemiyle (Infinia, General Electric Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA), düşük enerjili, paralel hole, yüksek rezolüsyonlu kolimatör kullanılarak %20 pencere aralığı ve Tc-99m'in 140 KeV luk fotopiki ile yapıldı. Soğuk MİBİ liyofilize hazır kiti, 250 mCi/3cc Tc-99m ile birleştirilip 100 °C'de 10 dk su banyosunda kaynatıldıktan sonra 15-30 °C'de oda ısısında soğutulması işleminden sonra her bir olguya ön koldan 0,31 mCi/kg (max 30mCi) Tc-99m MİBİ intravenöz enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyondan 15 dk sonra erken planar ve SPECT, 2 saat sonra geç planar görüntüleme yapıldı. Planar görüntüleme anterior-posterior pozisyonda, 256x256 matriks ile 10 dakikalık statik görüntü edinimi şeklinde yapıldı. SPECT görüntüleme 180° sirküler orbitte, 128x128 matriks ile projeksiyon zamanı 20 sn olarak 32 adımda tamamlandı.

Tc-99m MİBİ sintigrafisi görsel olarak değerlendirildi. Lezyon tutulumu lezyon dışı tiroid dokusu tutulumuna göre sınıflandı. Lezyonun tutulumu ile zemin aktivite ve/veya tiroid dokusu tutulumu ile eşit veya daha az ise "izoaktif", lezyonun aktivite tutulumu ile zemin aktivite ve/veya tiroid dokusu aktivitesinden fazla ise "hiperaktif" olarak değerlendirildi.

3.5. Biyopsi

TIRADS 3-4-5 lezyona sahip olgularda; supin pozisyonda, baş ekstansiyon durumuna getirildikten sonra cilt antiseptik ajanla temizlendi. Ultrason probu steril kılıf ile örtüldü. %2 lidokainli sprey ile lokal anestezi sağlandı. Hastaya işlem sırasında konuşmaması ve yutkunmaması gerektiği söylendi. 27G- 10 ml enjektör ile ultrason kılavuzluğunda nodülün içerisine girildi ve aspire edilerek sitolojik örnek alındı. Alınan örnekler lamlara yayıldı. Alkol ile fiske edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. Alkol ile fiske edilen materyal Papanicolaou boyası ile boyandıktan sonra Bethesda raporlama sistemine göre değerlendirilmiştir.

3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayırıştırılması

Her bir olgudan ön koldan 5 ml venöz kan örneği Etilen Diamin Tetra Asetik asit (EDTA) içeren tüplere alındıktan sonra yarım saat içinde 3800RPM de 10 dakika santrifüj edilerek plazma ve kan ürünlerine ayrılmıştır. Plazma ve kan örnekleri kryo tüplere aktararak daha sonra kullanılmak üzere -20 C de saklanmıştır. Doku örnekleri, sitolojik örnekleme için tiroid biyopsisi sonrası enjektörde kalan dokuların SF ile yıkanması sonucu elde edilmiştir. EDTA'lı tüpe alınıp daha sonra kullanılmak üzere -20 derecede saklanmıştır.

Kullanılan cihazlar

- Real Time PCR (Light Cycler2.0-Roche)
- Otomatik İzolasyon Cihazı (Doku ve Plazma örnekleri için-EZ1 Advanced XL-QIAGEN)
- Santrifüj (Rotofix 32A- Hettich)
- Mikrosantrifüj (Mikro 120-Hettich)
- Nanodrop (Nanophotometer, Implen)
- Derin dondurucu (Uğur)
- Vorteks (IKA VortexGenius 3)
- Otomatik pipet seti HTL Lab Solution (1-10 µl,10-100µl ve 100-1000µl)

Kullanılan sarf malzemeleri

- DNeasy Blood&Tissue Kit-QIAGEN (Manuel kan izolasyonu için kullanıldı)
- EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Plazma ve doku izolasyonu için kullanıldı;)
- LightCyclerFastStart DNA Master SYBR Green I kit (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany Ref 12239264001)
- Kapiller (Light CyclerKapiller 20µl)
- EDTA'lı tüp
- 2ml steril ependorf tüpleri
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

Kullanılan primerler

Çalışmamızda daha önce Richard Cawthon tarafından dizayn edilmiş olan primer setleri kullanıldı. Kromozomlarda tek kopya olarak bulunan ve psödogeni bulunmayan betaglobulin geni referans gen olarak seçildi. Primerler standart HPLC yöntemi ile sentez edilerek kuru şekilde teslim alındı (ThermoFisher-scientific).

Telomere primerleri dizisi;

Tel1;5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'

Tel2;5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'

Beta globulin primerleri dizisi;

HBG1;5'-GCTTCTGACACAACGTGTTCCTACTAGC-3'

HBG2;5'-CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

3.6.1. DNA İzolasyonu

Plazmadan DNA izolasyonu: Plazma örnekleri EZ1 Virus Mini Kit v2.0 kiti kullanılarak, EZ1 Advanced XL-QIAGEN otomatik izolasyon cihazı ile izolasyon yapılmıştır. DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20°C'ye kaldırılmıştır.

Kandan DNA izolasyonu: DNeasy Blood&Tissue Kit-QIAGEN kullanılarak üreticinin kan ve vücut sıvılarından DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20°C'ye kaldırılmıştır.

Dokudan DNA izolasyonu: Doku örnekleri EZ1 Virus Mini Kit v2.0 kiti kullanılarak, EZ1 Advanced XL-QIAGEN otomatik izolasyon cihazı ile izolasyon yapılmıştır. DNA konsantrasyonları 5-30ng/µl arasında olacak şekilde dilüe edilip -20°C'ye kaldırılmıştır.

3.6.2. Q-PCR Yöntemi ile Telomer Uzunluğu Ölçümü

3.6.2.1. Standartların Hazırlanması

Tüm çalışmalarda kalibratör olarak sağlıklı genç bireyden alınan kan örneğinden elde edilen DNA kullanıldı. Kalibratör ile normalize edilen çalışmalarda her çalışmada standart eğri gerekli değildir. Örneklerin hedef/referans gen ratioları kalibratör hedef/referans gen ratio ile normalize edildiğinden sonuçlar sadece hedef ve referans genin farklı PCR verimliliklerinden etkilenmektedir. Bunu ortadan kaldırmak için analiz edilirken PCR verimliliği 2 olarak ayarlanabilir.

3.6.2.2. Numunelerin Telomer ve Betaglobulin PCR çalışmasına alınması

HPLC ile sentez edilen primerler 100 pmol/μl ana stoklar halinde sulandırıldı ve PCR için 10 pmol/μl ara stoklar hazırlanarak -20°C'ye kaldırıldı. Numuneler telomer ve betaglobulin primerleri kullanılarak, Tablo 6'daki miktarlara uygun şekilde PCR çalışmasına alındı. Örnekler Light Cycler 2.0 (Roche) cihazında çalışıldı. Tablo 7 ve 8'de belirtilen programlar kullanılarak Real-time PCR (Roche Lightcycler2.0) cihazında kantifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler duplike çalışıldı.

Tablo 6. PCR çalışması hazırlığı

PCR Bileşenleri	Miktar
SYBR (10X)	1 μl
MgCl ₂ (final konst; 2mM)	0.4 μl
Primer F (stok 10pmol/μl)	0,3 μl
Primer R (stok 10pmol/μl)	0,3 μl
DNA 30ng Distile su	10 μl ye tamamlayacak şekilde
TOPLAM	10 μl

Tablo 7. Telomer kantitasyon protokolü

Programın adı	Hedef sıcaklık (°C)	Kazanma modu	Süre	Siklus	Analiz modu
Preinkübasyon	95	Yok	10 dk	1	Yok
Amplifikasyon				35	Kantifikasyon
	95	Yok	10 s		
	58	Yok	1 dk		
	72	Tek	10 s		
Erime eğrisi	95	Yok	5 s	1	Erime eğrisi
	40	Yok	1 dk		
	97	Cont	-		

Tablo 8. Betaglobulin Kantitasyon Protokolü

Programın adı	Hedef sıcaklık (°C)	Kazanma modu	Süre	Siklus	Analiz modu
Preinkübasyon	95	Yok	10 dk	1	Yok
Amplifikasyon				40	Kantifikasyon
	95	Yok	10 s		
	56	Yok	15 s		
	72	Tek	10 s		
Erime eğrisi	95	Yok	5 s	1	Erime eğrisi
	40	Yok	1 dk		
	97	Cont	-		

3.6.2.2.3. Kantitatif Telomer Uzunluğu Değerlendirilmesi

PCR verimliliği %100 kabul edildiğinde telomer/single copy gene (T/S) oranı şu şekilde hesaplanmaktadır:

$$T/S \text{ ratio} = [2^{-Ct(\text{telomer})} / 2^{-Ct(\text{beta globin})}]^{-1} = [2^{Ct(\text{telomer}) - Ct(\text{beta globin})}]^{-1} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = [Ct(\text{telomer}) - Ct(\text{beta globin})]$$

$$\text{Relatif T/S ratio} = 2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_T - \Delta Ct_{\text{kalibratör}}$

Analizler Light Cyler Software 4.1 de kanal 530 da Relative Quantification Monocolor ile analiz edildi. Her bir örneğin telomer uzunluğu hesaplaması ΔCt [Ct (telomer)/ Ct (tek kopya gen)] yöntemi ile telomer (T)-tek kopya gen (S) oranı (T/S ratio) hesaplandı. Örneklerin T/S oranı kalibratör T/S oranı ile normalize edilerek ($2^{-(\Delta Ct_k - \Delta Ct_s)} = 2^{\Delta\Delta Ct_s}$) relatif T/S oranı belirlendi. Sonuçlar kalibratörün n katı olarak belirlendi. Örneğin telomer Ct değeri 20.94, beta globulin Ct değeri 27.43 olan bir hastanın retelif telomer uzunluğu $\frac{20.94}{27.43}$ şekilde hesaplanır (kalibratör telomer Ct 21.15, kalibratör beta globulin Ct 27.49).

$$T/S \text{ Ratio} = (2^{20.94} / 2^{27.43}) - 1 =$$

$$2^{27.43} / 2^{20.94} = 180822629,8 / 2011722,666 = 89,88447205$$

$$\text{Kalibratör T/S Ratio} = (2^{21,15} / 2^{27,49}) - 1 = 2^{27,49} / 2^{21,15} = 81,00842201$$

$$\text{Relatif T/S Ratio} = 89,88447205 / 81,00842201 = 1,1$$

Sonuç olarak örnek, kalibratörün 1,1 katı olarak saptanmıştır.

3.7. İstatistiksel analiz

Araştırmanın verileri elektronik ortamda SPSS 26.0 paket programına aktarılmıştır. Veri kontrolü ve analizler bu programda yapılmıştır. Tanımlayıcı verilerin gösterilmesinde yüzdeler, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde Ki-Kare, Kruskal-Wallis, Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır. Tam kan, plazma ve doku rölatif T/S ratio değerlerinin maligniteyi yakalama için kesim noktası (Cut off) belirlemek amacıyla ROC Curve analizi yapılmış olup grafikler sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmamıza yaşları 19-85 arasında değişen (ortalama $52,66 \pm 13,14$) 101 kadın (%79), 27 erkek (21) olmak üzere toplam 128 hasta dahil edildi. Hastaların tamamının Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi ve tiroid biyopsi sonuçları bulunurken; 98 hastanın kan, plazma ve doku telomer uzunlukları genetik yöntemlerle ölçülebildi.

Ultrasonografik olarak TİRADS 3-4-5 olarak değerlendirilen ve biyopsi alınan hastaların, Bethesda sınıflamasına göre elde edilen patoloji sonuçlarına göre; 96 hastada benign, 11 hastada AUS/FL-US, 3 hastada folliküler neoplazi veya şüphesi (Hurtle hücreli dahil), 1 hastada malignite şüphesi, 17 hastada ise malignite rapor edilmiştir (Tablo 10). Tiroid malignitesi saptanan 17 vakanın 14'ü papiller karsinom, 2'si papiller karsinom folliküler varyant ve 1 tanesi primer tiroid lenfoması histopatoloji tipine sahip idi (Tablo 11).

Patoloji sonuçlarına göre 3 gruba ayırdığımız olgularımızın gruplara göre ortalama yaş (min-maks) ve cinsiyet dağılımları ise şu şeklideydi; Benign grupta, ortalama yaş $53,46 \pm 12,72$ (19-85), %81,25 (78) kadın, %18,75 (18) erkek hasta; Şüpheli grupta ortalama yaş $49,53 \pm 15,13$ (19-77), %86,66 (13) kadın, %13,33 (2) erkek; Malign grupta ortalama yaş $50,88 \pm 13,95$ (20-77), %58,82 (10) kadın, %41,17 (7) erkek bulunmakta idi. Gruplar arasında yaş ($p=0.544$) ve cinsiyet ($p=0.083$) açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 9).

4.2. Tiroid Nodüllerinin Ultrasonografik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Malignite şüphesi nedeniyle tetkik edilen nodüllerin en büyük çaplarına göre ortalama boyutları; Benign grupta, $22,04 \pm 10,43$ mm; Şüpheli grupta $18,73 \pm 9,04$ mm; Malign grupta $22,29 \pm 15,54$ mm idi. Bu 3 grupta nodül çapları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark elde edilmedi ($p=0.456$) (Tablo 9).

Çalışma popülasyonumuz güncel kılavuzlar göre biyopsi endikasyonu olan TİRADS 3-4-5 hastalardan oluşmaktaydı. Benign, şüpheli ve malign gruplardaki TİRADS kategorilerinin dağılımı incelendiğinde; benign grupta en fazla (%54,16) TİRADS 3, şüpheli grupta en fazla TİRADS 4 (%40), malign grupta en fazla TİRADS 5 bulunması klinik olarak beklenen bir sonuçtur. TİRADS kateogisinde malignite riski arttıkça, malign patolojik sonuç çıkma olasılığı da artmaktadır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu fark anlamlı olarak saptandı. İstatistiksel anlamlılığın TİRADS 5 grubunda malign patolojik sonucun yüksek çıkmasına bağlı olduğu saptanmıştır (p=0.001) (Tablo 9).

4.3. Tc-99m MİBİ Sintigrafi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Tiroid nodüllerinde malignite varlığını araştırmak amaçlı yapılan Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisinin gücü ve yeterliliği istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

Benign grupta (96 kişi) biyopsi alınan nodül, MİBİ sintigrafisinde 76 (%70,17) kişide izoaktif (gerçek negatif) olarak, 20 (20,83) kişide ise hiperaktif (yanlış pozitif) olarak izlendi. Bu durumda Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisinin benign nodülleri saptamadaki spesifitesi %79,16 ve negatif prediktif değeri %83,51 olarak hesaplandı.

Malign grupta (17 kişi) biyopsi alınan nodül, MİBİ sintigrafisinde 11 (%70,17) kişide hiperaktif (gerçek pozitif) olarak, 6 (%35,30) kişide ise izoaktif (yanlış negatif) olarak izlendi. Bu durumda Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisinin malign nodülleri saptamadaki sensitivitesi %64,70 ve pozitif prediktif değeri %29,72 olarak hesaplandı. Ayrıca Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisinin tanısasal doğruluğu %67,96 idi (Tablo 12).

Şüpheli grupta (15 kişi) biyopsi alınan nodül, MİBİ sintigrafisinde 6 (%40) kişide izoaktif, 9 (%60) kişide hiperaktif olarak izlendi. Şüpheli gruptaki hastaların daha sonraki tekrar biyopsi sonuçları ve/veya opere olmuşlarsa operasyon sonrası biyopsi sonuçlarına ulaşılamadığı için, sintigrafinin bu gruptaki geçerlilik ve güvenilirliği hesaplanamamıştır. Şekil 13'te Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi, gerçek pozitif, yanlış pozitif, gerçek negatif, yanlış negatif hasta örneği gösterilmiştir.

Diferansiyel tiroid maligniteleri dışında saptadığımız primer tiroid lenfoması olgusuna ait görüntü Şekil 14'te gösterilmiş olup tüm tiroidi kaplayan sert fikse nodülde erken geç görüntülerde radyoaktivite tutulumu izlenmiştir. Ayrıca erken ve geç görüntülerde Tc-99m MİBİ tutulumu gösteren sağ supraklavikular lenf nodu saptanmıştır.

Tablo 9. Çalışma grubu hastalarının demografik ve klinik özellikleri

Klinik Karakteristikler	Çalışma Grubu(n=128)			
	Benign Grup (n=96)	Şüpheli Grup (n=15)	Malign Grup (n=17)	p
Yaş (ort.± SS) (Min-Maks)	53,46±12,72 (19-85)	49,53±15,13 (19-77)	50,88±13,95 (20-77)	0,544
Cinsiyet n (%)				
Kadın	78 (81,25)	13 (86,66)	10 (58,82)	0,083
Erkek	18 (18,75)	2 (13,33)	7 (41,17)	
Nodül Çapı				
Ort (mm) (Min-Maks)	22,04±10,43 (5,0-48,0)	18,73±9,04 (5,0-35,0)	22,29±15,54 (10,0-60,0)	0,456
TİRADS				
3 n (%)	52 (54,16)	6 (40,0)	2 (11,76)	0,001
4 n (%)	23 (23,95)	5 (33,33)	3 (17,64)	
5 n (%)	21 (21,87)	4 (26,66)	12 (70,58)	
MİBİ Sintigrafisi				
İzoaktif n (%)	76 (83,51)	9 (9,89)	6 (6,59)	
Hiperaktif n (%)	20 (54,05)	6 (16,21)	11 (29,72)	

Tablo 10. Bethesda sınıflamasına göre tiroid biyopsi sonuçları

Gruplar	Benign Grup	Şüpheli Grup			Malign Grup	Toplam
		AUS FL-US	Foliküler Neoplazi Veya Şüphesi (Hurtle hücreli dahil)	Malignite Şüphesi		
Biyopsi Sonuçları (Bethesda)	Benign	AUS FL-US	Foliküler Neoplazi Veya Şüphesi (Hurtle hücreli dahil)	Malignite Şüphesi	Malign	
Sayı	96	11	3	1	17	128
Yüzde	75,0	8,59	2,34	0,78	13,23	%100

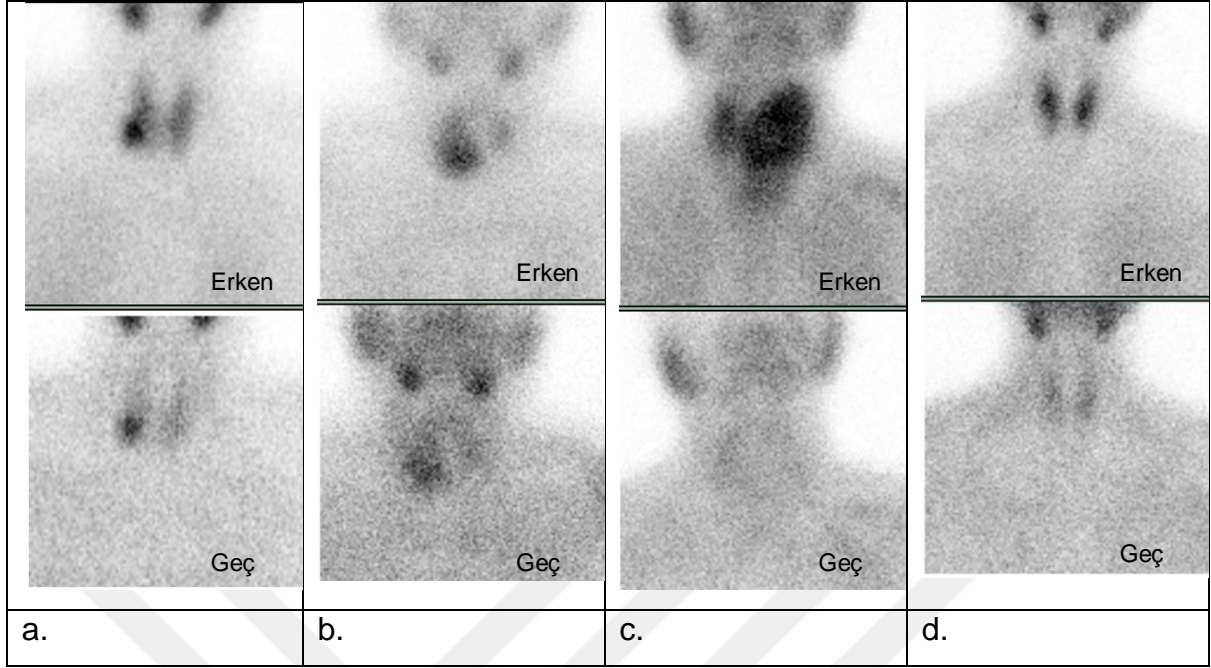
Tablo 11. Malign gruptaki hastaların tiroid biyopsi sonuçlarının histopatolojik tipleri

Histopatolojik Tip	Sayı	Yüzde
Papiller Karsinom	14	82,35
Papiller Karsinom Folliküler Varyant	2	11,76
Primer Tiroid Lenfoma	1	5,88

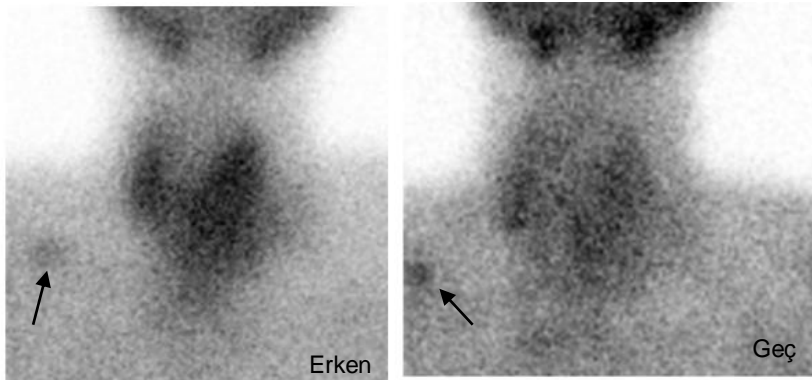
Tablo 12. Tc-99m MİBİ sintigrafisinin malign-benign nodül saptamadaki sensitivite, spesifite, pozitif prediktif ve negatif prediktif değer oranları.

Sintigrafi Sonucu	Patoloji Sonucu		
	Benign Grup n (%)	Şüpheli Grup n (%)	Malign Grup n (%)
Hiperaktif Nodül n=37	20 (20,83)	6 (40)	11 (64,70)
İzoaktif Nodül n= 91	76 (79,17)	9 (60)	6 (35,30)
Toplam n=128	96 (%100)	15 (%100)	17 (%100)

Sensitivite %64,70; spesifite %79,16; pozitif prediktif değer %29,72; negatif prediktif değer %83,51, tanısal doğruluk %67,96



Şekil 13 Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi hasta örnekleri: a) Gerçek pozitif bir hasta örneği; hiperaktif olarak saptanan nodülün biyopsi sonucu papiller tiroid karsinomu (sağ lob 22mm nodül) olarak raporlanmıştır; b) Yanlış pozitif bir hasta örneği; hiperaktif olarak saptanan nodülün biyopsi sonucu benign (sağ lob 35mm nodül) olarak raporlanmıştır; c) Sintigrafisi gerçek negatif bir hasta örneği; izoaktif olarak saptanan nodülün biyopsi sonucu benign (sağ lob 42mm nodül) olarak raporlanmıştır; d) Yanlış negatif bir hasta örneği; izoaktif olarak saptanan nodülün biyopsi sonucu papiller tiroid karsinomu (sağ lob 17mm nodül) olarak raporlanmıştır.



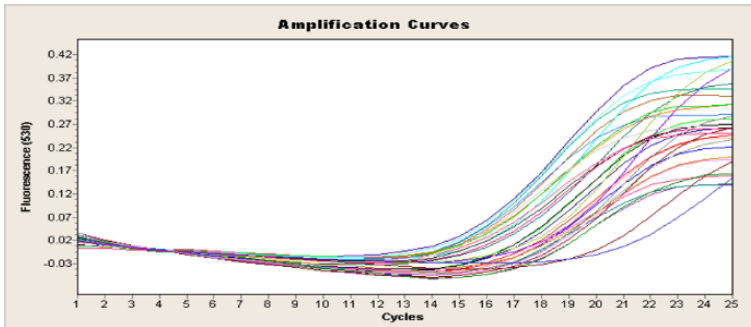
Şekil 14. Tc-99m MİBİ tiroid sintigrafisi primer tiroid lenfoması hasta örneği. Ok işareti ile Tc-99m MİBİ tutulumu gösteren supraklavikular lenf nodu izlenmektedir.

4.4. DNA izolasyon sonuçları

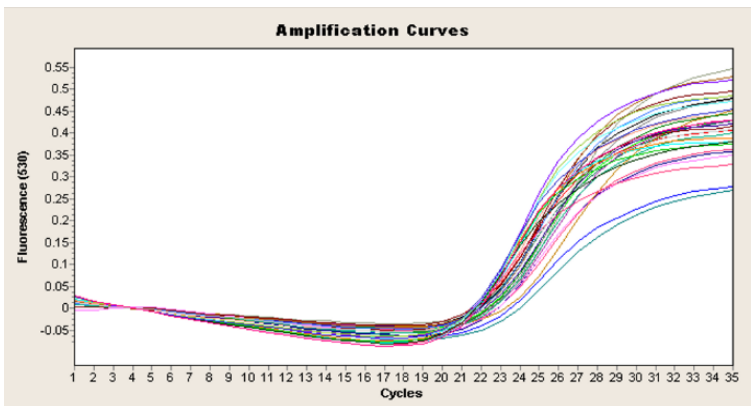
Çalışmaya katılan 98 hastanın kan, plazma ve biyopsi dokusundan elde edilen DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacı ile örnekler nanodrop ile ölçüm yapıldı DNA miktarları 20-50 ng/μl olarak bulundu.

4.5. Kantitatif Telomer Uzunluğu Ölçümü Sonuçları

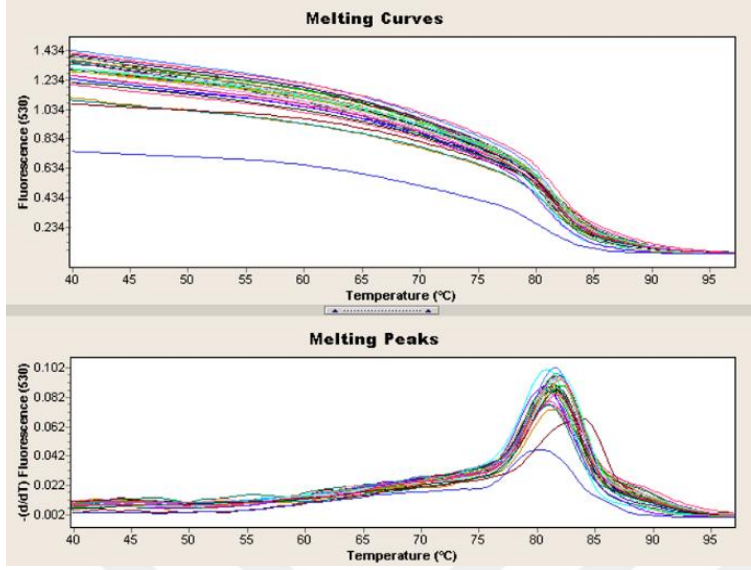
Q-PCR ile telomer ölçümünde; telomerik tekrarlara primerlerin bağlanıp oluşan ürünlerin kantitasyonu ile telomer uzunluğunun saptanabilmesidir. Telomerik tekrarlar arttıkça bağlanan primer sayısı ve buna bağlı ürün sayısı artacaktır. Hastalara ait telomer ve betaglobulin çalışması amplifikasyon eğrileri şekil 9 ve 10'da gösterilmiştir. Sybergreen kullanımına ait primer dimerizasyon veya non spesifik bağlanma kontrolü için erime eğrisi analizi sonuçları şekil 11 ve 12 de gösterilmiştir. Tüm örnekler aynı erime noktasında toplanmıştır.



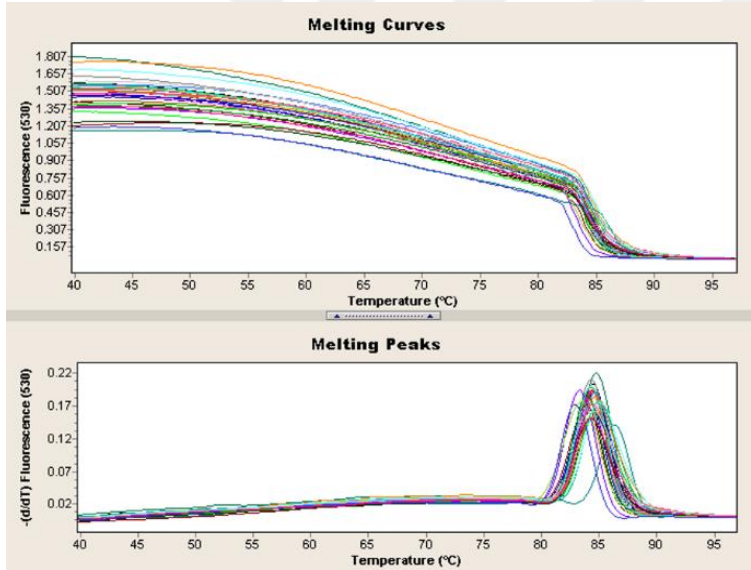
Şekil 9: Telomerik Tekrar Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 10: Betaglobulin Gen Ürünlerinin Amplifikasyon Eğrileri



Şekil 11: Telomer Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü



Şekil 12: Betaglobulin Çalışması Erime Eğrisi Analiz Görüntüsü

4.6. Kan, Plazma ve Doku Telomer Uzunluklarının Karşılaştırılması

Telomer uzunluk ölçümü yapılan 98 kişilik hasta grubunun 77 tanesinin patoloji sonucu benign, 7 tanesinin şüpheli, 14 tanesinin malign idi. Tam kan rölatif T/S ratio; benign grupta $3,89 \pm 3,27$, şüpheli grupta $3,45 \pm 3,80$, malign grupta $4,24 \pm 3,41$ olarak ölçülmüş olup gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı

(p=0.668) (Grafik 1). Plazma rölaf T/S ratio; benign grupta $2,09\pm 4,29$, şüpheli grupta $1,80\pm 2,08$, malign grupta $0,84\pm 0,66$ olarak ölçülmüş olup gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0.472) (Grafik 2). Doku rölaf T/S ratio; benign grupta $0,58\pm 1,03$, şüpheli grupta $1,51\pm 2,82$, malign grupta $0,55\pm 1,08$ olarak ölçülmüş olup gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0.396) (Grafik 3).

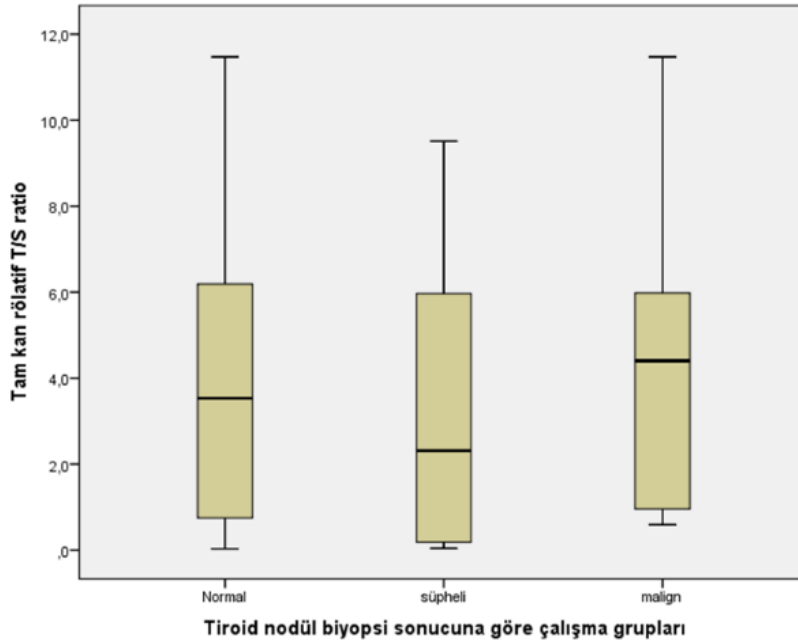
Sonuç olarak gruplar arasında tam kan rölaf T/S ratio plazma rölaf T/S ratio ve doku rölaf T/S ratio değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği saptandı (Tablo 13). Her ne kadar istatistiksel bir fark yaratmasa da malign gruptaki hastaların tam kan rölaf T/S ratio değerlerinin diğer gruplardan daha büyük olduğu görüldü. Plazma rölaf T/S ratio değerlerinde ise tersi bir durum söz konusu olup benign grupta, şüpheli ve malign gruba göre daha uzun ortalama plazma rölaf T/S ratio değerleri elde edildi. Yine malign ve benign gruptaki doku rölaf T/S ratio ortalamalarının birbirine çok yakın olması dikkati çekmektedir. Her 3 grupta kan, plazma ve doku telomer uzunlukları incelendiğinde, her bir grupta telomer uzunluklarının Tam kan >Plazma>Doku şeklinde sıralandığı görülmektedir (Tablo 14).

Tablo 13. cfDNA telomer uzunluğu değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

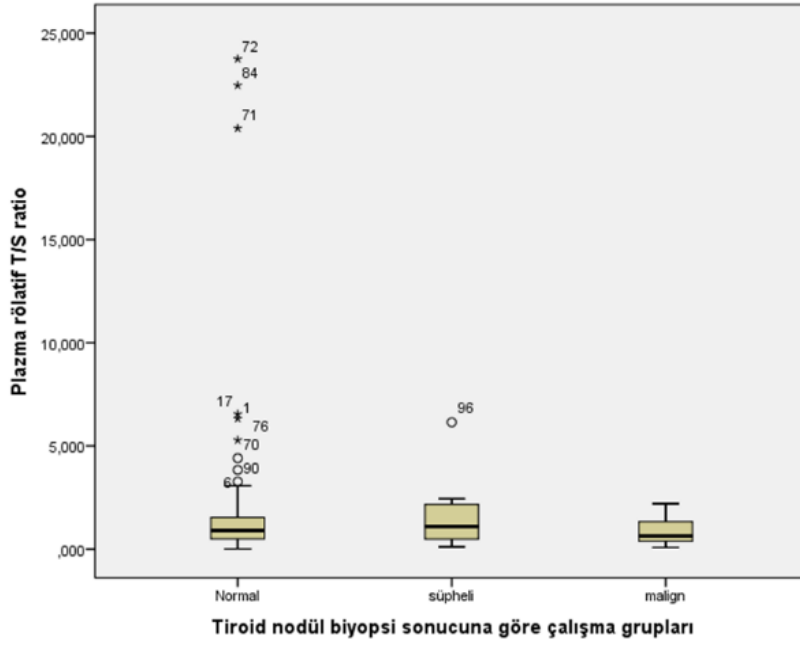
cfDNA Grupları	Çalışma Grubu (n=98)			
	Benign Grup (n=77)	Şüpheli Grup (n=17)	Malign Grup (n=14)	p
Tam kan rölaf T/S ratio (ort.± SS) (Min-Maks)	$3,89\pm 3,27$ (0,03-11,47)	$3,45\pm 3,80$ (0,04-9,51)	$4,24\pm 3,41$ (0,59-11,74)	0.668
Plazma rölaf T/S ratio (ort.± SS) (Min-Maks)	$2,09\pm 4,29$ (0,008-23,75)	$1,80\pm 2,08$ (0,11-6,14)	$0,84\pm 0,66$ (0,07-2,20)	0.472
Doku rölaf T/S ratio (ort.± SS) (Min-Maks)	$0,58\pm 1,03$ (0,005-6,86)	$1,51\pm 2,82$ (0,07-7,83)	$0,55\pm 1,08$ (0,01-4,08)	0.396

Tablo 14. Tüm gruplardaki telomer uzunluklarının ikili karşılaştırılması

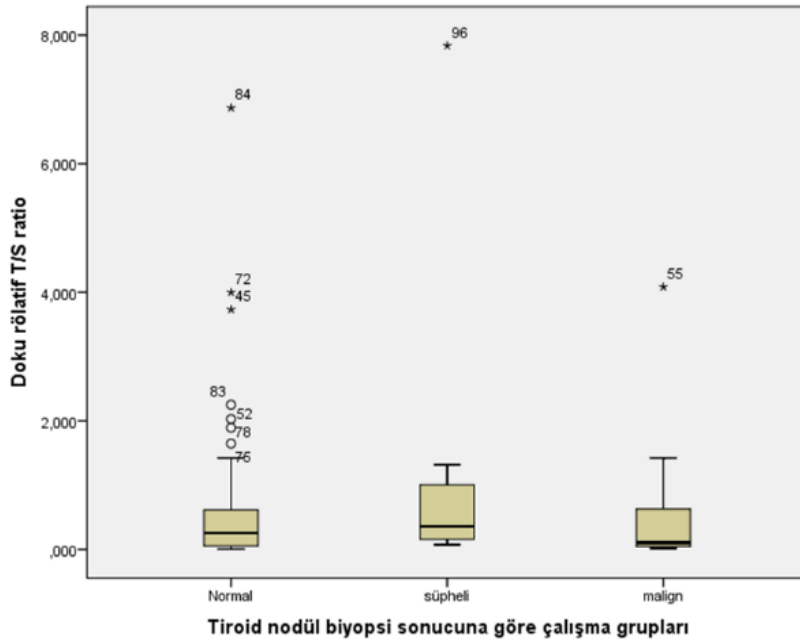
n=98	Benign Grup (n=77)	Şüpheli Grup (n=7)	Malign Grup (n=14)
Tam Kan-Plazma rölatif T/S			
r	0,380	-0,107	0,354
p	0.001	0,819	0,215
Plazma-Doku rölatif T/S			
Z	0,306	0,714	0,240
p	0.007	0,071	0,409
Doku-Tam Kan rölatif T/S			
Z	0,026	-0,321	0,169
p	0,822	0,482	0,563



Grafik 1. Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p=0.668$) tam kan rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği.

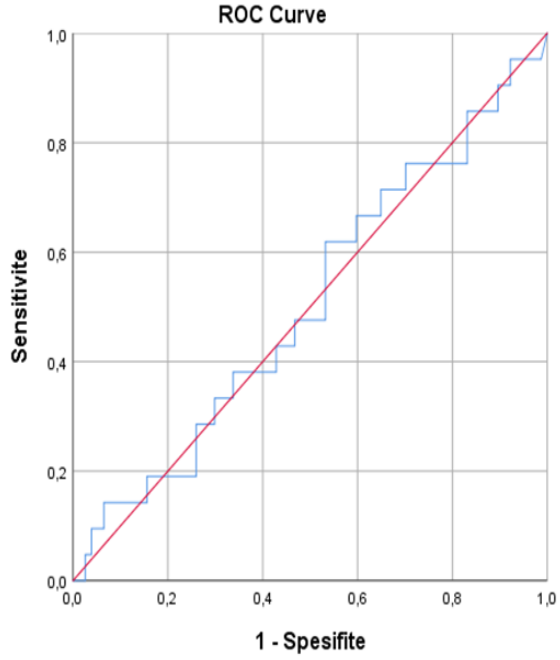


Grafik 2. Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p= 0.472$) plazma rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği.



Grafik 3. Çalışma grupları arasında anlamlı fark saptanmayan ($p=0.396$) tiroid biyopsi dokusu rölatif T/S ratio değerlerinin kutu (box-plot) grafiği.

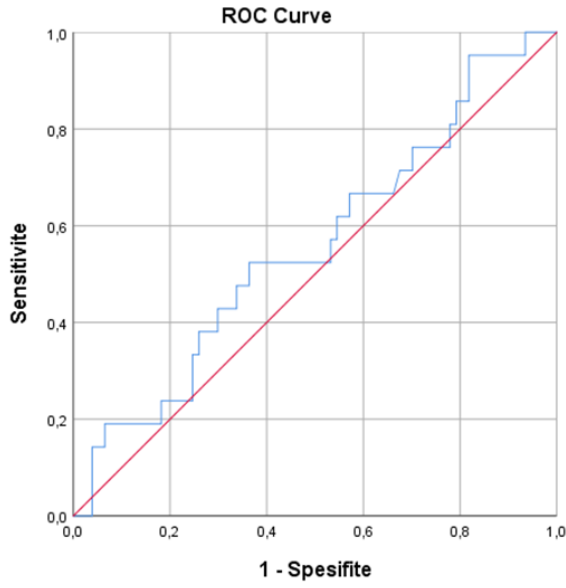
Diğer taraftan yapılan ROC curve analizlerinde de tam kan rölaf T/S ratio için eğri altında kalan alanı (AUC=Area Under Curve) AUC=0,507; plazma rölaf T/S ratio için AUC=0.558, doku rölaf T/S ratio için AUC=0.507 bulundu ki bu değerler tanısal doğruluk olarak yetersiz bir değerlerdir (Grafik 4-5-6).



Diagonal segments are produced by ties.

Eğri altındaki alan	Standart hata	p	%95 Güven aralığı
0,507	0,072	0,924	0,365-0,648

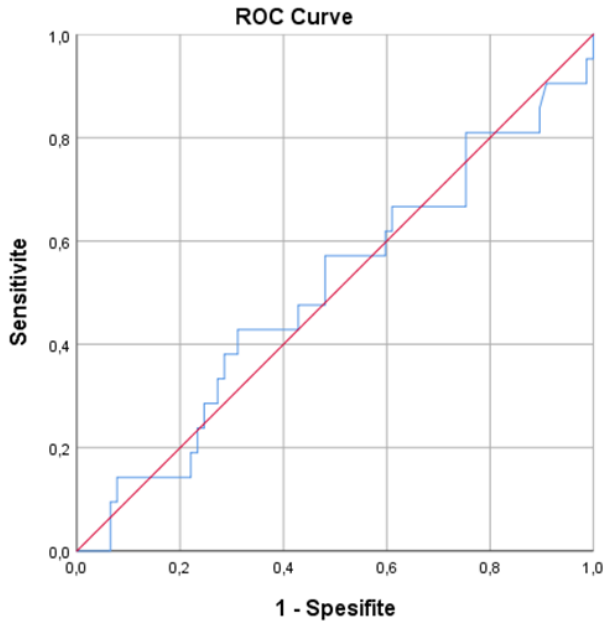
Grafik 4. Tam kan rölaf T/S ratio ROC Curve analiz sonucu



Diagonal segments are produced by ties.

Eğri altındaki alan	Standart hata	p	%95 Güven aralığı
0,558	0,071	0,416	0,418-0,698

Grafik 5. Plazma rölatif T/S ratio ROC Curve analiz sonucu



Diagonal segments are produced by ties.

Eğri altındaki alan	Standart hata	p	%95 Güven aralığı
0,504	0,074	0,959	0,359-0,648

Grafik 6. Tiroid biyopsi doku rölatif T/S ratio ROC Curve analiz sonucu

5. TARTIŞMA

Tiroid bezinde yer kaplayan, çevresindeki normal tiroid dokusundan kıvam olarak farklı, radyolojik olarak sınırları ayrılabilen küresel veya ovoid şekilli lezyonlar olarak tanımlanan tiroid nodülleri çok yaygın bir klinik problemdir. Tiroid bezine ait en sık hastalık grubunu oluşturan nodül sıklığının yaşla arttığı, 50 yaş üzerinde sonografik sıklığın %50'lerin üzerinde bulunduğu bilinmektedir. Tiroid nodülü etiyojisinde nedenleri arasında malign ve benign patolojiler yer alır. Tiroidin malign tümörleri tüm kanserler içinde %1'lik bir oran teşkil etmektedir. Güncel tanı algoritması laboratuvar testleri, tiroid US, tiroid sintigrafisi ve gerekirse US kılavuzluğunda ince iğne aspirasyon sitolojisini içerir. Bir tiroid nodülü saptandığında, öncelikli yaklaşım nodüllerin yaklaşık %5'inde var olan kanser riskinin dışlanması ve gereksiz cerrahinin azaltılmasıdır. Tiroid hastalıklarının tanısında en yaygın kullanılan görüntüleme yöntemi olan US, nodüllerin malignite riski hakkında kabaca bilgi verir. İlâveten US yapılırken yüksek derecelerde “intra” ve “interobserver” değişkenliğinin olduğu bilinen bir gerçektir. Tiroid hastalıklarının değerlendirilmesinde değişik amaçlarla ve farklı radyofarmasötik ve yöntemlerle yapılan radyonükleid görüntüleme faydalı bilgiler sağlar. Ancak tiroid nodüllerinin malign benign ayırımında katkısı sınırlıdır (97). Günümüzde tiroid nodüllerinin benign malign ayırımında en uygun ve güvenilir yöntem TİİAB kabul edilmektedir. Ancak, göz ardı edilemeyecek sayıda hastada sitoloji sonuçları belirsiz olarak bildirilmektedir. İlâveten bazı sitoloji sonuçlarında tanı için yetersiz olmaktadır. Tekrarlanan biyopsiye rağmen nodüllerin %7 kadarında tanı konulamaz, bu nodüllerde malignite oranı ise %20'ler civarında ve normale göre yüksektir. Yapılan biyopsilerin yanlış negatifliği %1,7 civarındadır. Bu nedenle, takiplerde nodülün değişen US özellikleri ve/veya anlamlı büyüme saptandığında ikinci bir biyopsi gerekebilir.

Tiroid kanserinin saptanması için kullanılan yöntemlerin yukarıda özetlenen sınırlılıkları nedeniyle yeni noninvaziv yöntemler üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmada Tc-99m MİBİ ile yapılan sintigrafik görüntülemenin ve DNA telomer uzunluk ölçümünün malign ve benign tiroid nodüllerini ayırt etmedeki rolünü değerlendirmeyi amaçladık.

Akciğer, meme, beyin, lenfoma, kemik ve yumuşak doku gibi malignitelerin değerlendirilmesinde kullanılan Tc-99m MİBİ sintigrafisi, tiroid kanserlerinin öngörülmesi amacıyla da araştırılmıştır. Bildirilen çalışmalarda dahil edilme kriterlerindeki ve kullanılan metotlardaki heterojenliğin yanında bulunan tanısal performans değerleri arasında da belirgin farklılıklar mevcuttur. Genel olarak, Tc-99m MİBİ sintigrafi tiroid nodülünün değerlendirilmesi için katkı sağlayacağı düşünülen ve uygun maliyetli bir yöntem gibi görünmektedir. Ancak mevcut kılavuzlarda tiroid nodüllerinin kanser riskinin öngörülmesi için Tc-99m MİBİ sintigrafisinin kullanılmasına yönelik bir öneri bulunmamaktadır.

Treglia G ve ark. tarafından bildirilen 21 çalışmayı içeren bir meta-analizde, önceki teknesyum perteknetat veya iyot-123 taramasının nihai sonuçlarına bakılmaksızın, malign tiroid nodüllerini saptamada Tc-99m MIBI taramasının havuzlanmış duyarlılığı ve özgüllüğü lezyon başına sırasıyla %85.1 ve %45.7 bulunmuş. Tc-99m perteknetat veya iyot-123 taramalarında hipofonksiyone nodüller hakkındaki verilerle sınırlı bir alt analiz yapıldığında havuzlanmış duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %82,1 ve %62.8 idi. Araştırmacılar bu görüntüleme yönteminin geleneksel tanı teknikleri temelinde maligniteden şüphelenilen tiroid nodüllü hastalarda yardımcı olabileceğini ve hipofonksiyone tiroid nodüllerinde daha yüksek özgüllüğe ulaşılabilirliğini ifade etmişler (112). Bu analize dahil edilen çalışmalarda nodüller içinde Tc-99m MIBI retansiyonunu değerlendirmek için yazarlar tarafından çeşitli yorumlama kriterleri kullanılmıştır: herhangi bir radyo-izleyici tutulumunu pozitif kabul edilmesi; normal tiroid bezine kıyasla yoğun, zayıf veya yok olarak derecelendirme; hedef-arka plan oranı veya kalıcılık indeksi gibi yarı niceliksel indeksler kullanılması.

Soliter hipofonksiyone tiroid nodülü olan ve sitolojik foliküler neoplazm tanısı olan hastalarda, benign ve malign tiroid nodüllerini ayırt etmek için mutasyon analizi ile 99mTc-MIBI tiroid sintigrafisini karşılaştırmak amacıyla prospektif bir çalışma yürütülmüş. Bu çalışmada Tc-99m MIBI görsel analizinin benign ve malign nodülleri ayırt etmedeki duyarlılığı, özgüllüğü, doğruluğu, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla %62, %95, %87, %83 ve %88 iken; yarı kantitatif analiz için duyarlılık, özgüllük, doğruluk, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif

değeri sırasıyla %100, %96, %98, %88 ve %100 bulunmuş (115). Bu sonuçlara göre araştırmacılar Tc-99m MIBI sintigrafisinin mutasyon analizinden önemli ölçüde daha doğru olduğunu, hatta negatif bir Tc-99m MIBI taramasının maligniteyi güvenilir bir şekilde dışlayabileceğini ifade etmişler (162-165).

Tc-99m MIBI taraması, tiroid malignitelerini preoperatif olarak tanımlama girişiminde önerilmiştir, ancak onkositik lezyonlar için farklı sonuçlar bildirilmiştir. Sitolojik olarak nonkositik veya onkositik foliküler neoplazm tanısı konan soğuk tiroid nodülü olan hastaların prospektif olarak incelendiği bir çalışmada, Tc-99m MIBI sintigrafisi preoperatif malign onkositik lezyonları ayırt etmede düşük bir özgüllük göstermekle birlikte yardımcı bir yöntem olarak önerilmiştir. Ayrıca onkositik olmayan nodüllerde, semikantitatif yöntemin görsel olandan daha doğru olduğu ve tiroid lezyonlarında Tc-99m MIBI tutulumu ile çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein-1 (MRP1) arasında güçlü bir negatif ilişki olduğu gösterilmiştir (114). Campenni A ve ark.'nın yaptığı prospektif bir çalışmada Tc-99m MIBI sintigrafisinin tiroid nodüllerinde malignite riskini değerlendirmek için genel duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek (sırasıyla %100 ve %90,9) bulunmuş (116). Çalışmaya US'de maksimal çapta ≥ 15 mm şüpheli nodül olan, Tc-99m perteknetat sintigrafisinde soğuk ve Bethesda sistemine göre sitolojik tanı sınıf III veya IV olan hastalar dahil edilmiş ve Tc-99m MIBI sintigrafisi kantitatif olarak değerlendirilmiş. Hürthle hücre adenomlu hastaları negatif hasta grubundan çıkardıktan sonra, genel duyarlılık ve özgüllük %100'e ulaştığı bildirilmiş.

Wale A ve arkadaşlarının araştırmasında, yüksek NPV'si nedeniyle Tc-99m MIBI sintigrafisinin tanısız olmayan ve neoplastik olmayan lezyonları için maligniteyi faydalı bir şekilde dışlayabildiği gösterilmiştir (166). Düşük özgüllüğü nedeniyle Tc-99m MIBI sintigrafisinin birinci basamak bir araştırma olarak önerilemeyeceği, ancak ikinci basamak bir tetkik olarak gereksiz cerrahi azaltılabileceği ifade edilmiştir. Kombine İA/MIBI stratejileri, soliter veya baskın tiroid nodüllerinin yönetiminde potansiyel olarak uygun maliyetli olduğunu iddia etmişlerdir. Sitolojisi belirsiz tiroid nodüllerinin malignitesini öngörmede F-18 FDG-PET/CT'nin duyarlılığı ve doğruluğu Tc-99m MIBI taramasından ve US'den daha yüksek olduğu gösterilmiş (167).

Çalışmamızda US'de şüpheli nodül olan (TIRADS 3, 4, 5) ve Bethesda sistemine göre sitolojik tanı sınıf 1'in dışında olan hastaların Tc-99m MİBİ sintigrafisi görsel olarak analiz edilmiştir. Tiroid nodüllerinin malign/benign ayrımında Tc-99m MİBİ sintigrafisinin sensitivitesini %64,70, spesifitesini %79,16, pozitif prediktif değerini %29,72, negatif prediktif değerini %83,51 ve doğruluğunu %67,96 olarak saptadık. Elde ettiğimiz sonuçlar genel olarak literatürde bildirilen çalışmalarla uyumlu olmakla beraber; literatürdeki çalışmalarda hasta seçimindeki ve kullanılan metotlardaki heterojenlik birebir kıyaslamayı mümkün kılmamaktadır.

Son zamanlarda tiroid nodüllerinin benign-malign ayrımı için likit biyopsi ile elde edilen verilere dayalı incelemeler yapılmıştır. Likit biyopsi metodlarından birisi de hücrelerin telomer uzunluklarını ölçme temeline dayanmaktadır. Telomerler, tekrarlayan DNA dizilerini ve ilişkili proteinleri içeren kromozom uçlarının koruyucu yapılarıdır. İnsan somatik hücrelerinde telomerler, semikonservatif DNA replikasyonu ile her hücre bölünmesiyle kademeli olarak kısaltılır ve aşırı derecede kısalmış telomerlere sahip hücreler yaşlanır ve apoptoza uğrar. Bununla birlikte, embriyonik kök hücreler ve çoğu kanser hücresi gibi kendini yenileyen hücreler, telomer kısalmasının neden olduğu hücre yaşlanması veya apoptozun üstesinden gelerek ölümsüzlük kazanmak için telomerleri koruyabilir. Telomer onarımı için iki mekanizma tanımlanmıştır: telomeraz aktivasyonu ve telomerazdan bağımsız bir telomer bakım mekanizması olan telomerlerin alternatif uzamasının (ALT) aktivasyonu. Tüm kanser hücrelerinin %85-95'i telomeraz eksprese ederken, ~%5-15'i ALT yolu aktivasyonu sergiler (144). Telomeraz sadece embriyonik ve kök hücrelerde aktif olmakla kalmaz, aynı zamanda tiroid kanseri de dahil olmak üzere malignitelerin %90'ından fazlasında upregüle olur ve kanser hücrelerinin sınırsız replikasyonunu sağlar (145). Telomeraz iki alt birimden oluşur: telomeraz RNA ve telomeraz ters transkriptaz (TERT). TERT mutasyonları, iyi diferansiye papiller tiroid kanserinin %11,3'ünde, foliküler tiroid kanserinin %17,1'inde, yaygın invaziv Hurthle hücreli karsinomun %32'sinde, kötü diferansiye tiroid kanserinin %43,2'sinde ve anaplastik tiroid kanserinin %40,1'inde saptanabilmektedir (148). cfDNA, apoptoz veya nekroz sırasında kan dolaşımına giren nükleik asit parçalarıdır. Kanda serbest dolaşan DNA'nın bir kısmı bir tümör klonundan kaynaklanır ve dolaşımdaki tümör DNA'sı (ctDNA) olarak adlandırılır. Normalde bu

parçalar makrofajlar tarafından temizlenir, ancak kanserdeki hücrelerin aşırı üretiminin ve kan dolaşımından etkin bir şekilde temizlenmesini azaltan tümör bölgelerinde yetersiz immün hücre infiltrasyonunun cfDNA miktarını artırdığına dair çok sayıda araştırma mevcuttur. Bu artan cfDNA'lardaki mutasyonlar aynı hastaların primer tümörlerinden elde edilen DNA'daki mutasyonlar ile karşılaştırıldığında özdeş genetik değişiklikler içerdikleri ortaya çıkarılmıştır. Ancak cfDNA artışı malignite varlığına spesifik olmayıp; travma, sepsis, aseptik inflamasyon, miyokard enfarktüsü, felç, transplantasyon, diyabet ve orak hücre hastalığı, lupus, ileri yaş gibi birçok durumda daha artış göstermektedir (168-170).

Ma H ve ark. yaptığı 21 yayın içeren meta analizde, daha kısa telomerlerin kanser riski, özellikle mesane ve akciğer kanserleri, sigarayla ilişkili kanserler, sindirim sistemi ve ürogenital sistem ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulundu (171). Normal peritümöral dokulara kıyasla tiroid kanser dokularında ve foliküler adenomlarda telomeraz aktivitesinin arttığı ve telomer uzunluğunun azaldığı bildirilmiştir (172,173). Capezzone M ve ark.'nın yaptığı çalışmada familial papiller tiroid karsinom hastalarının ortalama rölatif telomer uzunluğu neoplastik tiroid dokularında (0.87 ± 0.2) kısa olarak bulunmakla birlikte normal kontralateral tiroid dokularından (0.85 ± 0.11) ve ekstratiroidal dokulardan (0.85 ± 0.31) anlamlı fark bulunmamıştır. Aksine, sporadik papiller tiroid kanserli hastalarda ortalama rölatif telomer uzunluğu, neoplastik dokularda (1.73 ± 0.63), normal kontralateral dokulara (2.58 ± 0.89) ve ekstratiroidal dokulara (2.5 ± 0.86) kıyasla önemli ölçüde daha kısa bulunmuştur. Familial papiller tiroid kanserli olgularda ortalama rölatif telomer uzunluğu foliküler adenomlu olgulardan (1.6 ± 0.7) ve hiperplastik nodüllü olgulardan (2.2 ± 0.9) daha düşük olarak bulunmuştur ($p < 0.0001$) (174). Familial ve sporadik papiller tiroid karsinomlu olgularda ortalama rölatif telomer uzunluğunu karşılaştıran bir çalışmada familial ve sporadik papiller tiroid karsinomu için ortalama rölatif telomer uzunluğunu sırasıyla 0.80 (25-75. persentil, 0.65-0.92) ve 0.80 (25-75. persentil, 0.66-0.98) bulunmuş olup (familial ve sporadik) birbirleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (175). Başka bir çalışmada familial nonmedüller tiroid kanserli olgularda, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı daha kısa rölatif telomer uzunluğu saptanmıştır (0.98'e karşı 1.23). Familial nonmedüller tiroid kanserli hastalar ve kontrol grubu arasında hTERT, TRF1,

TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 ve POT1 gen kopya sayısı veya mRNA ekspresyonunda ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (176). Caria P ve ark. yaptığı çalışmada rölatif telomer uzunluğu, familyal PTK örneklerinde sporadik PTK örneklerinden önemli ölçüde daha kısa olarak bulunmuştur (sırasıyla ortalama 0.93 ve 1.9) (177). Tiroid kanseri subgrupları arasında telomer uzunluklarının karşılaştırıldığı çalışmada; 15 PTK'den 12'si (%80), 4 Folliküler Karsinom'dan 1'i (%25), 3 Hurtle Hücreli Karsinom'un tümü (%100) ve 12 FVPTK'nin 4'ü (%33) komşu normal tiroid dokusu ile karşılaştırıldığında çok kısa telomerlere sahip olarak saptanmıştır. Karsinomların geri kalanı, normal tiroid dokusununkine benzer telomer uzunluklarına sahip olarak bulunmuştur. Benign foliküler neoplastik alt gruplarda ise 12 folliküler adenom'dan 6'sı (%50) ve 6 hiperplastik nodüller'den 1'i (%17) komşu tiroid dokusuna göre daha kısa telomerlere sahip olarak saptanmıştır. Hiperplastik nodüllerde 9 kişiden 2'sinde (%22) kısa telomer bulunmuştur. Diğer tüm benign tümörler, komşu normal tiroid dokusuna benzer veya daha uzun telomere sahip olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada tiroid tümörlerinde telomer uzunlukları ortalamaları istatistiksel anlamlı olarak kıstadan uzuna PTK, FK/HK, FVPTC, FA/HA, hiperplastik olarak bulunmuştur (178). Başka bir çalışmada ise TIN2 adlı genin melanom ve papiller tiroid kanseri ile ilişkili olduğu ve diğer çalışmaların aksine bu mutasyon saptanan melanomlu ve papiller tiroid kanserli olgularda telomer uzunluğunda artış gösterilmiştir (179).

Lökositlerde telomer uzunluğunun ölçüldüğü prospektif bir çalışmada ortalama rölatif telomer uzunluğunun azalmış olarak saptanması, yüksek papiller tiroid karsinomu riski ile anlamlı şekilde ilişkili olarak bulunmuştur (180). Lökositlerde telomer uzunluğunun araştırıldığı bir başka regresyon analizinde daha kısa rölatif telomer uzunluğunun renal hücreli kanser riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulunmuştur (RCC'li grupta RTL 3.18 ± 1.50 , kontrol grubunda 4.39 ± 1.99) (181). Hematolojik malignitelerde telomer uzunluğu ölçümü yapılan bir çalışmada hematolojik malignite vakalarının daha kısa ortalama rölatif telomer uzunluğuna sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum hem ailevi hem de ailevi olmayan hematolojik malignite vakalarında gözlemlendi (182).

Dolaşımdaki cfDNA miktarının bazı biyolojik ve yaşam tarzı faktörleri ile ilişkisini araştıran bir çalışmada; akut egzersiz, pestisid maruziyeti ve stresin cfDNA'yı arttırdığı bulunmuştur. Sigara kullanımı, vücut kitle indeksi, hipertansiyon, sirkadyen ritm, cinsiyet, yaş ve kronik egzersizin tutarsız değişikliklere neden olduğu; iyonize radyasyonun cfDNA'yı azalttığı; alkol kullanımı ve menstruasyonun ise herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (183).

Endoskopi sonrası takip edilen olgularda gastrik kanser gelişme sürecinde cfDNA'da telomer uzunluklarını belirlemek için yapılan prospektif bir çalışmada gastrik kanser ve kontrol deneklerinden alınan başlangıç ve takip serumlarında, kısalmış telomerlerin gastrik kanser riskinde anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır (184). Meme kanserinin erken tanısı amacıyla cfDNA'daki telomer uzunluğu araştırılan bir çalışmada kontrol bireyleri ile karşılaştırıldığında, daha önce tedavi görmemiş meme kanseri hastalarında telomer uzunluğunda önemli bir düşüş saptanmıştır. Ayrıca cfDNA'daki telomer uzunluğu duktal karsinoma in situ grubunda kontrol grubuna kıyasla daha kısa olarak bulunmuştur (185). Klinik temelli bir HBV hasta kohortunda ctDNA'da rölatif telomer uzunluğunun HCC riskindeki prediktif rolünü değerlendirmek için yapılan prospektif bir çalışmada; başlangıç serumunda uzun rölatif telomer uzunluğunun HCC riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kısalmış telomerlerin kromozomal instabiliteyi indükleyerek ve neoplastik dönüşümü artırarak kanser gelişiminde bir rol oynayabileceğini gösteren çok sayıda kanıt olmasına karşın, artan sayıda yeni çalışma, sadece azalan değil, artan anormal telomer uzunluğunun da çeşitli kanserlerle bağlantılı olduğunu bildirmektedir (186).

Bildirilen çalışmalardan farklı olarak, araştırmamızda tam kanda lökosit, plazmada cfDNA ve tümör dokularındaki hücrelerde telomer uzunluklarını ölçerek birbirleriyle karşılaştırdık. Çalışma kohortunu oluşturan gruplar arasında lökosit, plazma cfDNA ve doku hücrelerindeki rölatif T/S değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, malign gruptaki hastaların lökosit rölatif T/S değerinin diğer gruplardan daha büyük olduğu görüldü. cfDNA rölatif T/S değeri ise benign grupta, şüpheli ve malign

gruba göre daha uzun bulundu. Yine malign ve benign gruptaki doku rölatif T/S ratio ortalamalarının birbirine çok yakın olması dikkati çekmektedir.

6. SONUÇ

Tiroid nodüllerinin malignite varlığını öngörmeye noninvaziv metotlar olan Tc-99m MİBİ sintigrafisinin ve DNA telomer uzunluklarının geçerlilik ve güvenilirliklerini araştırdığımız bu çalışmada;

Tc-99m MİBİ sintigrafisinin, literatürle uyumlu bir şekilde tiroid nodüllerinin malignite riskini öngörmeye makul bir tanısal performansa sahip olduğu sonucuna varıldı. Yüksek negatif prediktif değeri sebebiyle negatif bir Tc-99m MİBİ taraması, maligniteyi güvenilir bir şekilde dışlayabilmektedir.

Çalışma sonuçlarımıza göre; kan (lökosit), plazma (cfDNA) ve doku örneklerindeki DNA telomer uzunlukları, malign ve benign grupları ayırmada anlamlı bir istatistiksel sonuç göstermedi. Elde ettiğimiz bu sonuç, telomerik DNA uzunluklarının tiroid malignitesinin öngörülmesinde geçerli bir metod olabileceğini öngören sınırlı sayıdaki literatür bulgularıyla uyuşmamaktadır.

Tiroid nodüllerinin malignite değerlendirmesinde, Tc-99m MİBİ sintigrafisi telomer uzunluk analizinden daha doğru ve uygun maliyetli bir yöntem gibi gözükmektedir.

Çalışmamızda toplam ve subgrup hasta sayısındaki azlık, güvenli istatistiksel analiz yapılmasını kısıtlamıştır. Bu nedenle daha fazla vaka sayısı ile, prospektif, vaka kontrollü çalışmalara ve yöntemlerin standardizasyonuna ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Rosen RD, Sapra A. Embryology, Thyroid. [Updated 2021 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
2. Arlen D Meyers, Embryology of the Thyroid and Parathyroids, Mar 24, 2022, <https://emedicine.medscape.com/article/845125-overview>
3. Bruno A.PoliceniMD, Wendy R.K.SmokerMD, FACR,Deborah L.ReedeMD, Anatomy and Embryology of the Thyroid and Parathyroid Glands, Seminars in Ultrasound, CT and MRI Volume 33, Issue 2, April 2012, Pages 104-11
4. Brunicardi FC. Schwartz's Principles of Surgery. Lal G, Clark OH (eds), Thyroid, Parathroid and Adrenal, Tenth Edition, Newyork, 2015: 1521-1550.
5. Allen E, Fingeret A. Anatomy, Head and Neck, Thyroid. [Updated 2021 Jul 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-
6. Çetin E. İç hastalıkları 2.Cilt, 1. Baskı. 2008, 3703
7. Kuran O. Glandula Thyroidea Sistemantik Anatomi. 2000, 579- 83.
8. Srinivasan DK, Jayabharathi K, Chandrika M, Dheen K, Bay BH, Parameswaran R, Thyroid and Parathyroid Glands- Embryology and Surgical Anatomy, Endocrine Surgery, 1st Edition, Pages:7, 2022, eBook ISBN9780429197338
9. HaroldEllis, Anatomy of the thyroid and parathyroid glands, Surgery (Oxford) Volume 25, Issue 11, November 2007, Pages 467-468
10. Hansen JT. Embryology and surgical anatomy of the lower neck and superior mediastinum. Faik SA (ed). Thyroid Disease, endocrinology, surgery, nuclear medicine and radiotherapy. 2nd ed. New York: Lippincott - Raven Publisher. 1997, 15- 27.
11. Meller J, Becker W. The continuing importance of thyroid scintigraphy in the era of high-resolution ultrasound. Eur J Nucl Med, 2002; 29(Suppl 2): 425-8.
12. Uysal AR. Tirotoksikoz ve Hipertiroidizm. İşgör A. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1. baskı, İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık, 2000: 299-324.
13. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Thyroid Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version. 2021 Jan 13. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-.

- [Figure, Anatomy of the thyroid and] Available from:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65857/figure/CDR0000258038__198/
14. Skandalakis JE, Skandalakis PN, Skandalakis LJ. Anatomy of the Thyroid Gland. In Surgical Anatomy and Technique. Springer- Verlag. New York.1995, 11- 97.
 15. Skandalakis JE, Gray SW, Rowe JS. Anatomical Complications in General Surgery. 1986, 2- 36.
 16. Keith LM, Arthur FD. Neck in Clinically Oriented Anatomy 4 th ed. Toronto2000, 8: 1030-1
 17. Henry JF. Surgical anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands and rekürrent and external laryngeal nerves. Clark OH, Duh QY. Textbook of Endocrine Surgery. 1th ed, Philadelphia: WB Saunders, 1997: 8- 14.
 18. Sadler GP, Clark OH. Thyroid and parathyroid. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC(ed). Principles of Surgery. 7th ed. New York: McGraw-Hill. 1999, 1661- 1687.
 19. Sadler GP, Clark OH. Thyroid and parathyroid. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC (ed). Principles of Surgery. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 1999; 1661-1687
 20. Allen E, Fingeret A. Anatomy, Head and Neck, Thyroid. [Updated 2021 Jul 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470452/>
 21. İşgör A. İşgör A (ed). Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. 1. baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık. 2000, 3- 540
 22. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. [Updated 2021 May 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/>
 23. Núñez A, Bedregal P, Becerra C, Grob L F. [Neurodevelopmental assessment of patients with congenital hypothyroidism]. Rev Med Chil. 2017 Dec;145(12):1579-1587.
 24. Sorisky A. Subclinical Hypothyroidism - What is Responsible for its Association with Cardiovascular Disease? Eur Endocrinol. 2016 Aug;12(2):96-98.

25. Singh S, Sandhu S. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Jul 25, 2021. Thyroid Disease And Pregnancy.
26. Braun D, Schweizer U. Thyroid Hormone Transport and Transporters. *Vitam Horm.* 2018;106:19-44.
27. Ortiga-Carvalho TM, Chiamolera MI, Pazos-Moura CC, Wondisford FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr Physiol.* 2016 Jun 13;6(3):1387-428.
28. Kogai T, Brent GA. The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2012 Sep;135(3):355-70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.06.007. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22750642; PMCID: PMC3408573.
29. Mallya M, Ogilvy-Stuart AL. Thyrotropic hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018 Jan;32(1):17-25.
30. Rousset B, Dupuy C, Miot F. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. [Updated 2015 Sep 2]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A,, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285550/>
31. Laura Fugazzola, Chapter 56 - Thyroid Peroxidase Deficiency and Total Iodide Organification Defect, *Comprehensive Handbook of Iodine*, Academic Press, 2009, Pages 539-547
32. Mughal BB, Fini JB, Demeneix BA. Thyroid-disrupting chemicals and brain development: an update. *Endocr Connect.* 2018 Apr;7(4):R160-R186.
33. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2012 Sep;122(9):3035-43.
34. Salabè, G. (2001). Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55(1), 39–53.
35. Kleinau G, Vassart G. TSH Receptor Mutations and Diseases. [Updated 2017 Jul 24]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279140/>
36. Younis E. Oncogenesis of Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1191-1199. Published 2017 May 1.

37. Weerakkody Y, Jones J, Colloid nodule (thyroid). Reference article, Radiopaedia.org. (accessed on 25 Apr 2022)
38. Sato K, Miyakawa M, Onoda N, Demura H, Yamashita T, Miura M, Kasajima T, Yamazaki K, Obara T. Increased concentration of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in cyst fluid of enlarging and recurrent thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jun;82(6):1968-73.
39. Zhang Y, Ma XP, Deng FS. The effect of chronic lymphocytic thyroiditis on patients with thyroid cancer. *World J Surg Oncol.* 2014;12:277. Published 2014 Sep 1.
40. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Aug 30;7(10):569-80. doi: 10.1038/nrendo.2011.142. PMID: 21878896.
41. Özdemir S, Ozdemir O, (2014). The molecular etiological parameters in thyroid cancer. *Cumhuriyet Medical Journal.* 36. 128-146. 10.7197/1305-0028.2565.
42. Ljubic B, Pavlovski M, Roychoudhury S, Van Neste C, Salhi A, Genes and comorbidities of thyroid cancer, *Informatics in Medicine Unlocked*, Volume 25, 2021, 100680, ISSN 2352-9148, <https://doi.org/10.1016/j.imu.2021.100680>.
43. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Mar 13;11:102.
44. Armstrong MJ, Yang H, Yip L, Ohori NP, McCoy KL, Stang MT, Hodak SP, Nikiforova MN, Carty SE, Nikiforov YE. PAX8/PPAR γ rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma. *Thyroid.* 2014 Sep;24(9):1369-74.
45. Cinti R, Yin L, Ilc K, Berger N, Basolo F, Cuccato S, Giannini R, Torre G, Miccoli P, Amati P, Romeo G, Corvi R. RET rearrangements in papillary thyroid carcinomas and adenomas detected by interphase FISH. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;88(1-2):56-61.
46. Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Hermann MA, Grieco M. Ret oncogene activation in thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest.* 1992;89:1517-22. 10.1172/JCI115743
47. Taccaliti A, Boscaro M. Genetic mutations in thyroid carcinoma. *Minerva Endocrinol.* 2009 Mar;34(1):11-28. PMID: 19209125.

48. Ruco L, Scarpino S. The Pathogenetic Role of the HGF/c-Met System in Papillary Carcinoma of the Thyroid. *Biomedicines*. 2014;2(4):263-274. Published 2014 Oct 24.
49. Schiff BA, McMurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG, Kim S, Zhou G, Mandal M, Bekele BN, Holsinger FC, Sherman SI, Yeung SC, El-Naggar AK, Myers JN. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8594-602. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0690. PMID: 15623643.
50. McFadden DG, Vernon A, Santiago PM, Martinez-McFaline R, Bhutkar A, Crowley DM, McMahon M, Sadow PM, Jacks T. p53 constrains progression to anaplastic thyroid carcinoma in a Braf-mutant mouse model of papillary thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22;111(16):E1600-9.
51. Xu B, Ghossein R. Evolution of the histologic classification of thyroid neoplasms and its impact on clinical management. *Eur J Surg Oncol*. 2018;44(3):338-347.
52. Kakudo K. How to handle borderline/precursor thyroid tumors in management of patients with thyroid nodules. *Gland Surg*. 2018;7 (Suppl 1):S8-S18.
53. Ohba K, Mitsutake N, Matsuse M, Encapsulated papillary thyroid tumor with delicate nuclear changes and a KRAS mutation as a possible novel subtype of borderline tumor. *J Pathol Transl Med*. 2019;53:136–41.
54. Rosario PW. Noninvasive encapsulated papillary RAS-like thyroid tumor (NEPRAS) or encapsulated papillary thyroid carcinoma (PTC). *J Pathol Transl Med*. 2020;54(3):263-264.
55. Rossi ED, Papotti M, Faquin W, Larocca LM, Pantanowitz L. The Diagnosis of Hyalinizing Trabecular Tumor: A Difficult and Controversial Thyroid Entity. *Head Neck Pathol*. 2020;14(3):778-784.
56. Marchiò C, Da Cruz Paula A, Gularte-Merida R, Basili T, Brandes A, da Silva EM, Silveira C, Ferrando L, Metovic J, Maletta F, Annaratone L, Pareja F, Rubin BP, Hoschar AP, De Rosa G, La Rosa S, Bongiovanni M, Purgina B, Piana S, Volante M, Weigelt B, Reis-Filho JS, Papotti M. PAX8-GLIS3 gene fusion is a pathognomonic genetic alteration of hyalinizing trabecular tumors of the thyroid. *Mod Pathol*. 2019 Dec;32(12):1734-1743.

57. Limaiem F, Rehman A, Mazzone T. Papillary Thyroid Carcinoma. [Updated 2021 Sep 16]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536943/>
58. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016;26:1-133.
59. Ho AS, Luu M, Barrios L, Chen I, Melany M, Ali N, Incidence and mortality risk spectrum across aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *JAMA Oncol* 2020;6:706-13.
60. Jung CK. Papillary thyroid carcinoma variants with tall columnar cells. *J Pathol Transl Med* 2020;54:123.
61. Wong KS, Higgins SE, Marqusee E, Nehs MA, Angell T, Barletta JA. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: impact of change in WHO definition and molecular analysis. *Endocr Pathol* 2019;30:43-8.
62. (Longheu A, Canu GL, Cappellacci F, Erdas E, Medas F, Calò PG. Tall Cell Variant versus Conventional Papillary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Analysis in 351 Consecutive Patients. *J Clin Med* 2020;10:70.)
63. Ganly I, Ibrahimasic T, Rivera M, Nixon I, Palmer F, Patel SG. Prognostic implications of papillary thyroid carcinoma with tall-cell features. *Thyroid* 2014;24:662-70.
64. Shi X, Liu R, Basolo F, Giannini R, Shen X, Teng D. Differential clinicopathological risk and prognosis of major papillary thyroid cancer variants. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:264-74.
65. Bongers PJ, Kluijfhout WP, Verzijl R, Lustgarten M, Vermeer M, Goldstein DP. Papillary thyroid cancers with focal tall cell change are as aggressive as tall cell variants and should not be considered as low-risk disease. *Ann Surg Oncol* 2019;26:2533-9.
66. Jung CK. Papillary thyroid carcinoma variants with tall columnar cells. *J Pathol Transl Med* 2020;54:123.

67. Enriquez ML, Baloch ZW, Montone KT, Zhang PJ, LiVolsi VA. CDX2 expression in columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2012;137:722-6.
68. Massimo Bongiovanni MD, Maxime Mermoud MD, Sule Canberk MD, Columnar cell variant of papillary thyroid carcinoma: Cytomorphological characteristics of 11 cases with histological correlation and literature review, *Cancer cytopathology*, Volume 125, Issue 6, June 2017, Pages 389-397
69. Ieni A, Barresi V, Cardia R, Licata L, Di Bari F, Benvenga S. The micropapillary/hobnail variant of papillary thyroid carcinoma: a review of series described in the literature compared to a series from one southern Italy pathology institution. *Rev Endocr Metab Disord* 2016;17:521-7.
70. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017. p. 65-143.
71. Ohashi R. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: an under-recognized entity. *Endocr J* 2020;67:241-8.
72. Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, Caudill CM, Lloyd RV. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1478-84.
73. Pillai S, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: an update of its clinicopathological features and molecular biology. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;94:64-73.
74. Nathalie Chereau, Xavier Giudicelli, Francois Pattou, Diffuse Sclerosing Variant of Papillary Thyroid Carcinoma Is Associated With Aggressive Histopathological Features and a Poor Outcome: Results of a Large Multicentric Study, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 101, Issue 12, 1 December 2016, Pages 4603–4610,
75. Mills SE, Greenson JK, Hornick JI. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. 6th edn. (Wolters Kluwer Health, 2015). p. 533-94.
76. Lloyd RV, Osamura RY, G. Klöppel, Rosai J. WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs. 4th edn. (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2017. p. 66-67.

77. Asa SL. The current classification of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2019; 1-22.
78. Xu B, Ghossein R. Evolution of the histologic classification of thyroid neoplasms and its impact on clinical management. *Eur J Surg Oncol* 2018; 44(3): 338-47.
79. Prof. Dr. Bekir ÇAKIR, (2020), *Tiroid Kanseri Güncel Yaklaşım*, Akademisyen Kitabevi, Ankara
80. Baloch ZW, LiVolsi VA. Special types of thyroid carcinoma *Histopathology* 2018; 72: 40-52.
81. Di Furia M, Della Penna A, Salvatorelli A, Clementi M, Guadagni S. A single thyroid nodule revealing early metastases from clear cell renal carcinoma: case report and review of literature. *Int J Surg Case Rep.* 2017;34:96-99.
82. Na DG, Baek JH, Sung JY, Kim JH, Kim JK, Choi YJ, Seo H. Thyroid Imaging Reporting and Data System Risk Stratification of Thyroid Nodules: Categorization Based on Solidity and Echogenicity. *Thyroid.* 2016 Apr;26(4):562-72.
83. Salmaslıoğlu, A., Erbil, Y., Dural, C. Predictive Value of Sonographic Features in Preoperative Evaluation of Malignant Thyroid Nodules in a Multinodular Goiter. *World J Surg* 32, 1948 (2008).
84. Ozdemir D, Ersoy R, Cuhaci N, Arpaci D, Ersoy EP, Korukluoglu B, Guler G, Cakir B. Classical and follicular variant papillary thyroid carcinoma: comparison of clinical, ultrasonographical, cytological, and histopathological features in 444 patients. *Endocr Pathol.* 2011 Jun;22(2):58-65.
85. Hoang JK, Lee WK, Lee M, Johnson D, Farrell S. US Features of thyroid malignancy: pearls and pitfalls. *Radiographics.* 2007 May-Jun;27(3):847-60; discussion 861-5.
86. Campanella P, Ianni F, Rota CA, Corsello SM, Pontecorvi A. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2014 Apr 10;170(5):R203-11.
87. Pang T, Huang L, Deng Y, Wang T, Chen S, Gong X, Liu W. Logistic regression analysis of conventional ultrasonography, strain elastosonography, and contrast-enhanced ultrasound characteristics for the differentiation of

- benign and malignant thyroid nodules. PLoS One. 2017 Dec 11;12(12):e0188987.
88. Noyek A.M, Finkelstein D.M, Witterick I.J, Kirsh J.C. Diagnostic Imaging of the Thyroid Gland Falk SE. Thyroid Disease: Second Edition. Lippincott Raven. Philadelphia. 1997; 9: 135-43.
89. Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, Dominguez M. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. J Clin Endocrinol Metab. 2009 May;94(5):1748-51
90. Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, Hoang JK, Berland LL. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS): White Paper of the ACR TI-RADS Committee. (2017) Journal of the American College of Radiology: JACR. 14 (5): 587-595.
91. Haugen, B.R., Alexander, E.K., Bible, K.C., (2016) 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid, 26, 1-133.
92. Middleton WD, Teefey SA, Reading CC. Multiinstitutional Analysis of Thyroid Nodule Risk Stratification Using the American College of Radiology Thyroid Imaging Reporting and Data System. (2017) American Journal of Roentgenology. 208 (6): 1331-1341.
93. Xu T, Wu Y, Wu RX, Zhang YZ, Gu JY, Ye XH, Tang W, Xu SH, Liu C, Wu XH. Validation and comparison of three newly-released Thyroid Imaging Reporting and Data Systems for cancer risk determination. Endocrine. 2019 May;64(2):299-307. doi: 10.1007/s12020-018-1817-8. Epub 2018 Nov 24. PMID: 30474824.
94. Ha EJ, Na DG, Baek JH, Sung JY, Kim JH, Kang SY. US Fine-Needle Aspiration Biopsy for Thyroid Malignancy: Diagnostic Performance of Seven Society Guidelines Applied to 2000 Thyroid Nodules. Radiology. 2018 Jun;287(3):893-900. doi: 10.1148/radiol.2018171074. Epub 2018 Feb 21. PMID: 29465333.
95. Grani G, Lamartina L, Ascoli V, et al. Reducing the Number of Unnecessary Thyroid Biopsies While Improving Diagnostic Accuracy: Toward the "Right"

- TIRADS. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2019 Jan;104(1):95-102. DOI: 10.1210/jc.2018-01674. PMID: 30299457.
96. Töre G, Özkaliç H, Kir M, Yüksel D. TNTD, Tiroit Sintigrafisi Uygulama Kilavuzu 2.0 Nükleer Tıp Seminerleri. Nucl Med Semin 2015;1(1):41-43
97. Adalet I, Mudun A, Ünal SN, Türkmen C. Nükleer Tıp Görüntüleme Yöntemlerinde Temelilkeler. Nükleer Tıp Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayınları; 2012;1-13
98. Wang PW, Chen HY, Li CH, Liu RT, Chien WY, Tung SC. Tc-99m pertechnetate trapping and thyroid function in Hashimoto's thyroiditis. Clin Nucl Med. 1994 Mar;19(3):177-80.
99. Gharib H, Papini E, Paschke R. American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association on medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. Endocrine Practice 2010;16(1):1-43.
100. Üstün F, Torun N, the correlative imagings of the thyroid gland, Journal of Anatolian Medical Research 2018; 3(2): 1-23
101. Al R, Abdul H. Technical meeting of project counterparts on cyclotron production of I-123 . International Nuclear Information System. IAEA.2002.
102. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 135300, Iodide ion I-123. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Iodide-ion-I-123>. Accessed Apr. 26, 2022.
103. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid 2006;16:109-42.
104. Schneider MT, Glister O, Hall JP, Acio E, Kulkarni KP, Tran AT, Van Nostrand D. Thyroid cancer in functioning thyroid nodules. Presented at the 2012 ACNM Mid-Winter meeting.
105. Mirfakhraee S, Mathews D, Peng L, Woodruff S, Zigman [M.A solitary hyperfunctioning thyroid nodule harboring thyroid carcinoma: review of the literature. Thyroid Res. 2013;6(1):7)
106. Tonacchera M, Pinchera A, Vitti P. Assessment of nodular goitre. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2010;24(1):51-61.

107. Ashcraft MW, Van Herle AJ. Management of thyroid nodules II: scanning techniques thyroid suppressive and fine needle aspiration Head Neck Surg 1981; 3:297-322.
108. Larson M, Larson M, Li Z, Larson M, Li Z, Hall CL, Jensen E, McAllister DM, Kalyanaraman B, Zhao M. Physiological fluctuation of (99m)Tc-sestamibi uptake in normal mammary glands: a systematic investigation in female rats. Acta Radiol. 2009 Nov;50(9):975-8.
109. Siegel, J. A. (Ed.). (2004). Guide for Diagnostic Nuclear Medicine and Radiopharmaceutical Therapy. Society of Nuclear Medicine, Incorporated.
110. O'Doherty M.J., Coakley T.J. Parathyroid imaging. In: Ell P.J, Gambhir S.S eds: Nuclear Medicine in Clinical Diagnosis and Treatment, Third edition, volume I part 4. 2004. p. 35-44.
111. Crane P, Laliberté R, Heminway S, Thoolen M, Orlandi CJEjonm. Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. 1993;20 (1):20-5
112. Piwnica-Worms D, Chiu ML, Budding M, Kronauge JF, Kramer RA, Croop JMJC. Functional imaging of multidrug-resistant P-glycoprotein with an organotechnetium complex. 1993;53 (5):977-84.
113. Treglia G, Caldarella C, Saggiorato E, Ceriani L, Orlandi F, Salvatori M. Diagnostic performance of (99m)Tc-MIBI scan in predicting the malignancy of thyroid nodules: a meta-analysis. Endocrine. 2013;44:70-8.
114. Saggiorato E, Angusti I, Rosas R Martinese M, Finessi M, Arecco F. 99mTc-MIBI imaging in the presurgical characterization of thyroid follicular neoplasms: relationship to multidrug resistance protein expression. J Nucl Med. 2009;50 (11):1785-93.
115. Giovanella L, Campenni A, Treglia G, Verburg FA, Trimboli P, Ceriani L. Molecular imaging with (99m)Tc-MIBI and molecular testing for mutations in differentiating benign from malignant follicular neoplasm: a prospective comparison. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2016;43(6):1018-26
116. Campenni A, Giovanella L, Siracusa M, Alibrandi A, Pignata SA, Giovinazzo S. (99m) Tc-Methoxy-isobutyl-isonitrile scintigraphy is a useful tool for assessing the risk of malignancy in thyroid nodules with indeterminate fine-needle cytology. Thyroid. 2016;26(8):1101-9

117. Tonacchera M, Pinchera A, Vitti P. Assessment of nodular goitre. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*2010;24(1):51-61
118. Sager S, Vatankulu B, Erdogan E, Mut S, Teksoz S, Ozturk T. Comparison of F-18 FDGPET/CT and Tc-99m MIBI in the preoperative evaluation of cold thyroid nodules in the same patient group. *Endocrine.* 2015;50(1):138-45.
119. Czepczynski R. Nuclear medicine in the diagnosis of benign thyroid diseases. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2012; 15: 113-119
120. Cibas ES, Ali SZ 2009 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 19:1159–1165.
121. Cibas ES, Ali SZ 2009 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol* 132:658–665.
122. Edmund S. Cibas and Syed Z. Ali. *Thyroid.* Nov 2017. 1341-1346. <http://doi.org/10.1089/thy.2017.0500> Published in Volume: 27 Issue 11: November 1, 2017
123. Ali S, Cibas E 2018 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Second edition. Springer, New York, NY.
124. Yan Yan-yan, Guo Qiao-ru, Wang Feng-hua. Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol:9, 2021, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.639233> ,
125. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif.* 2019;17:100087. Published 2019 Mar 18.
126. Rafi I, Hill M, Hayward J, Chitty LS. Non-invasive prenatal testing: use of cell-free fetal DNA in Down syndrome screening. *Br J Gen Pract.* 2017;67(660):298-299.
127. Taylor -Phillips S, Freeman K, Geppert J. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis *BMJ Open* 2016;6:e010002.
128. Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon® 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2017 Apr;21(2):225-232.

129. Bettgowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* 6:224ra24.
130. Salvianti, F, Giuliani C, Petrone L, Mancini I, Vezzosi V, Pupilli C. (2017). Integrity and quantity of total cell-free DNA in the diagnosis of thyroid cancer: correlation with cytological classification. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1350.
131. Higazi AM, El Hini SH, El-Sharkawy EA, Gayyed MF, Aziz NA, Matta RA. Diagnostic Role of Cell-free DNA Integrity in Thyroid Cancer Particularly for Bethesda IV Cytology. *Endocr Pract.* 2021 Jul;27(7):673-681. doi: 10.1016/j.eprac.2021.02.005. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33601025.
132. Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, Alexandersen K, Huang YS, Tzou WS, Lin SR. Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg.* 2004 Jul;28(7):721-6. doi: 10.1007/s00268-004-7366-8. Epub 2004 Jun 8. PMID: 15185002.
133. Mohamed NA, Swify EM, Amin NF, Soliman MM, Tag-Eldin LM, Elsherbiny NM. Is serum level of methylated RASSF1A valuable in diagnosing hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis C? *Arab J Gastroenterol.* 2012 Sep;13(3):111-5. doi: 10.1016/j.ajg.2012.06.009. Epub 2012 Aug 9. PMID: 23122451.
134. Kang Z, Stevanović S, Hinrichs CS, Cao L. Circulating Cell-free DNA for Metastatic Cervical Cancer Detection, Genotyping, and Monitoring. *Clin Cancer Res.* 2017 Nov 15;23(22):6856-6862. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1553. Epub 2017 Sep 12. PMID: 28899967; PMCID: PMC7885032.
135. Vaidyanathan R, Soon RH, Zhang P, Jiang K, Lim CT. Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab Chip.* 2018 Dec 18;19(1):11-34. doi: 10.1039/c8lc00684a. PMID: 30480287.
136. Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, El-Rifai W, Bedognetti D, Batra SK, Haris M, Bhat AA, Macha MA. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer.* 2022 Mar 18;21(1):79.
137. Preethi KA, Selvakumar SC, Ross K, Jayaraman S, Tusubira D, Sekar D. Liquid biopsy: Exosomal microRNAs as novel diagnostic and prognostic

- biomarkers in cancer. *Mol Cancer*. 2022 Feb 16;21(1):54. doi: 10.1186/s12943-022-01525-9. PMID: 35172817; PMCID: PMC8848669.
138. Gold B, Cankovic M, Furtado LV, Meier F, Gocke CD. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2015;17(3):209-224.
139. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):112-23.
140. Cai LL, Ye HM, Zheng LM, Ruan RS, Tzeng CM. Circulating tumor cells (CTCs) as a liquid biopsy material and drug target. *Curr Drug Targets*. 2014;15(10):965-72.
141. Aravanis AM, Lee M, Klausner RD. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell*. 2017 Feb 9;168(4):571-574. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.030. PMID: 28187279.
142. De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2019 Mar;40(3):172-186. doi: 10.1016/j.tips.2019.01.006. Epub 2019 Feb 5. PMID: 30736982.
143. García-Silva S, Gallardo M, Peinado H. DNA-Loaded Extracellular Vesicles in Liquid Biopsy: Tiny Players With Big Potential? *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 21;8:622579. doi: 10.3389/fcell.2020.622579. PMID: 33575258; PMCID: PMC7872099.
144. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008;42:301–334.
145. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in cancer biology*. 2011;21:349–353.
146. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*. 1991;256:271–282.
147. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:171–181.
148. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobрева M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di

- Fagagna F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology*. 2012;14:355–365.
149. Maser RS, DePinho RA. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 2002;297:565–569.
150. Capezzone M, Marchisotta S, Cantara S, Pacini F. Telomeres and thyroid cancer. *Curr Genomics*. 2009;10(8):526-533.
151. McKelvey BA, Umbricht CB, Zeiger MA. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Regulation in Thyroid Cancer: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jul 31;11:485. doi: 10.3389/fendo.2020.00485. PMID: 32849278; PMCID: PMC7412884.
152. Wang N, Kjellin H, Sofiadis A, Fotouhi O, Juhlin CC, Bäckdahl M. Genetic and epigenetic background and protein expression profiles in relation to telomerase activation in medullary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. (2016) 7:21332–46.
153. McKelvey Brittany A., Umbricht Christopher B., Zeiger Martha A., Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Regulation in Thyroid Cancer: A Review , *Frontiers in Endocrinology*, Vol:11, 2020,
154. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. (2016) 23:R143–55.
155. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. (2014) 159:676–90.
156. Oishi N, Kondo T, Ebina A, Sato Y, Akaishi J, Hino R. Molecular alterations of coexisting thyroid papillary carcinoma and anaplastic carcinoma: identification of TERT mutation as an independent risk factor for transformation. *Mod Pathol*. (2017) 30:1527–37.
157. Bell RJA, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. (2015) 348:1036–9.
158. Yuan X, Mu N, Wang N, Strååt K, Sofiadis A, Guo Y. GABPA inhibits invasion/metastasis in papillary thyroid carcinoma by regulating DICER1 expression. *Oncogene*. (2019) 38:965–79.
159. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Busonero G, Formichi C, Benigni M. Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with

- familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* (2011) 96:E1852–6.
160. Liu T, Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene.* (2014) 33:4978–84.
161. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016 Jan;26(1):1-133. doi: 10.1089/thy.2015.0020. PMID: 26462967; PMCID: PMC4739132.
162. Sciacchitano S, Lavra L, Ulivieri A. Comparative analysis of diagnostic performance, feasibility and cost of different test-methods for thyroid nodules with indeterminate cytology. *Oncotarget.* 2017;8(30):49421-49442.
163. Arnefti S, Mettler J, Schmidt M, Faust M, Engels M, Schultheis A.M, Chiapponi C. Could Negative Tc-99m-Methoxyisobutylisonitrile (MIBI) Scintigraphy Obviate the Need for Surgery for Bethesda III and IV Thyroid Nodules? *Surgeries* 2021, 2, 260–267.
164. Rager O, Radojewski P, Dumont RA, Treglia G, Giovanella L, Walter MA. Radioisotope imaging for discriminating benign from malignant cytologically indeterminate thyroid nodules. *Gland Surg.* 2019;8(Suppl 2):S118-S125.
165. Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick, Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: executive summary of recommendations. *J Endocrinol Invest.* 2010;33(5 Suppl):51-6.
166. Wale A, Miles KA, Young B, Zammit C, Williams A, Quin J, Dizdarevic S. Combined (99m)Tc-methoxyisobutylisonitrile scintigraphy and fine-needle aspiration cytology offers an accurate and potentially cost-effective

- investigative strategy for the assessment of solitary or dominant thyroid nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 Jan;41(1):105-15.
167. Piccardo A, Puntoni M, Treglia G, Foppiani L, Bertagna F, Paparo F, Massollo M. Thyroid nodules with indeterminate cytology: prospective comparison between 18F-FDG-PET/CT, multiparametric neck ultrasonography, 99mTc-MIBI scintigraphy and histology. *Eur J Endocrinol* 2016;174:693-703.
168. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M (April 1994). "Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia". *British Journal of Haematology*. 86 (4): 774–779.
169. Vasioukhin V, Stroun M, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Anker P (May 1994). "K-ras point mutations in the blood plasma DNA of patients with colorectal tumors". *Challenges of Modern Medicine: Biotechnology Today*. 5: 141–150.
170. Butt AN, Swaminathan R (August 2008). "Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1137 (1): 236–42.
171. Ma H, Zhou Z, Wei S. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(6):e20466.
172. Capezzone M, Marchisotta S, Cantara S, Pacini F. Telomeres and thyroid cancer. *Curr Genomics*. 2009;10(8):526-533.
173. Kammori M, Takubo K, Nakamura KI, Furogouri E, Endo H, Kanauchi H, Mimura Y, Kaminishi M. Telomerase activity and telomere length in benign and malignant human thyroid tissues. *Cancer Lett*. 2000;159:175–181.
174. Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Busonero G, Formichi C, Benigni M, Capuano S, Toti P, Pazaitou-Panayiotou K, Caruso G, Carli AF, Palumbo N, Pacini F. Telomere length in neoplastic and nonneoplastic tissues of patients with familial and sporadic papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):E1852-6. doi: 10.1210/jc.2011-1003. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21865371.
175. Jendrzewski J, Tomsic J, Lozanski G. Telomere length and telomerase reverse transcriptase gene copy number in patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):E1876-E1880.

176. He M, Bian B, Gesuwan K. Telomere length is shorter in affected members of families with familial nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2013;23(3):301-307.
177. Caria P, Cantara S, Frau DV, Pacini F, Vanni R, Dettori T. Genetic Heterogeneity of HER2 Amplification and Telomere Shortening in Papillary Thyroid Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10):1759. Published 2016 Oct 21.
178. Wang Y, Meeker AK, Kowalski J. Telomere length is related to alternative splice patterns of telomerase in thyroid tumors. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1415-1424.
179. He H, Li W, Comiskey DF. A Truncating Germline Mutation of TINF2 in Individuals with Thyroid Cancer or Melanoma Results in Longer Telomeres. *Thyroid*. 2020;30(2):204-213.
180. Ji Li, Changming An, Haitao Zheng, Tianshui Lei, Nasha Zhang, Yan Zheng, Ming Yang, Leukocyte Telomere Length and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 104, Issue 7, July 2019, Pages 2712–2718
181. Park JY, Luu HN, Park HY, Lin HY, Radlein S, Di Pietro G, Yeo CD, Kim SJ, Kang N, Antwi S, Sexton WJ, Spiess PE, Dickinson S, Parker A. Telomere length in peripheral blood leukocytes and risk of renal cell carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2019 Jul;8(Suppl 4):S397-S403. doi: 10.21037/tcr.2019.06.36. PMID: 35117117; PMCID: PMC8798989.
182. Blackburn NB, Charlesworth JC, Marthick JR. A retrospective examination of mean relative telomere length in the Tasmanian Familial Hematological Malignancies Study. *Oncol Rep*. 2015;33(1):25-32.
183. Yuwono NL, Warton K, Ford CE. The influence of biological and lifestyle factors on circulating cell-free DNA in blood plasma. *Elife*. 2021 Nov 9;10:e69679.
184. Shi Y, Zhang Y, Zhang L, Ma JL, Zhou T, Li ZX, Liu WD, Li WQ, Deng DJ, You WC, Pan KF. Telomere Length of Circulating Cell-Free DNA and Gastric Cancer in a Chinese Population at High-Risk. *Front Oncol*. 2019 Dec 17;9:1434. doi: 10.3389/fonc.2019.01434. PMID: 31921685; PMCID: PMC6928050.

185. Wu X, Tanaka H. Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. *Oncotarget*. 2015;6(30):29795-29807.
186. Wan S, Hann HW, Ye Z. Prospective and longitudinal evaluations of telomere length of circulating DNA as a risk predictor of hepatocellular carcinoma in HBV patients. *Carcinogenesis*. 2017;38(4):439-446.

