

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TİROİD KANSERİ TANISINDA TSH RESEPTÖR VE
E- KADERİN GEN METİLASYONUNUN SİTOLOJİK VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kinyas KARTAL

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**TİROİD KANSERİ TANISINDA TSH RESEPTÖR VE
E- KADERİN GEN METİLASYONUNUN SİTOLOJİK VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kinyas KARTAL

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Z. Volkan KAYNAROĞLU**

**Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
Tarafından 013 D03 101 004 proje numarası ile desteklenmiştir**

**Ankara
2013**

ETİK KURUL DEĞERLENDİRME RAPORU



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
 Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
 E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

██████████ 238
 Sayı: 16969557

04 Mart 2013

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27.02.2013 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2013/04
Proje No : LUT 12/117 (Değerlendirme Tarihi 26.09.2012)
Karar No : LUT 12/117 - 14

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, öğretim üyelerinden Prof. Dr. Volkan Kaynaroglu'nun sorumlu araştırmacı olduğu Prof. Dr. Yeşim Gaye Güler Tezel ve Dr. Kemal Kösemehmetoğlu ile birlikte çalışacakları Dr. Kınyas Kartal'ın tezi olan LUT 12/117 kayıt numaralı ve "Tiroid Kanseri Tanısında TSH ve ECAD Reseptör Metilasyonunun Sitolojik ve Histopatolojik Olarak Araştırılması" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Ornek Buken (Üye) | 10. Doç. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| İZİNLİ | 11. Doç. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. Hakan S. Orer (Üye) | 12. Doç. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | İZİNLİ |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | |

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince olduğu gibi bu çalışmanın yürütülmesi sırasında da benden bilgisini, yardımını ve zamanını esirgemeyen Prof. Dr. Volkan KAYNAROĞLU'na

İhtisas sürem boyunca bana her zaman babacan tavrıyla yaklaşan, cerrahide olduğu gibi yaşantımda da ortak birçok zevki paylaştığım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ömer ARAN'a

Varlığıyla beni daima mutlu eden, cerrahi bilgisiyle olduğu kadar, güncel olaylar karşısında verdiği mücadeleyle de bizlere ışık tutan, yol gösteren Prof. Dr. Zafer ÖNER'e

Uzmanlık eğitimimin ilk yılından, son saatine kadar, cerrahi bilgi ve becerisini esirgemediği gibi eleştirilerini de esirgemeyerek yol gösteren, emek veren Prof. Dr. Erhan HAMALOĞLU'na

Birlikte en uzun süre çalıştığım Doç. Dr. Bülent TIRNAKSIZ'a

İhtisasımın başladığı ilk vizitten itibaren yanımda olan ve bundan sonra ki meslek hayatımda da yanımda olacağına inandığım Uzm. Dr. Onur AYDIN'a

Tezimin yapım aşamasında yardımını benden esirgemeyen Dr. Gaye Güler TEZEL'e, Dr. Sevgen Önder'e, Dr. Kemal Kösemehmetoğlu'na ve Biyolog Özgür Arda GÜNAY'a

İhtisas hayatımın başlangıcında, zaten zor olan adaptasyon sürecimi daha da zorlaştıran, sonrasında tanışıp evlenmeye karar verdikten sonra varlığıyla tüm hayatımı kolaylaştıran sevgili eşim Dr. Gülbiz KARTAL'a

Ben nöbetçiyken uyumayan annem Süreyya KARTAL'a, her zaman arkamda dağ gibi duran babam Nadir KARTAL'a, ablam Berfin KARTAL'a ve kardeşim Beril KARTAL'a

İhtisas eğitimim boyunca bana sabırla eşlik eden ve bu zor süreci benimle paylaşan Hacettepe Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalının tüm öğretim ve araştırma görevlilerine, yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma ve isimlerini buraya sığdıramadığım tüm sağlık emekçilerine şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Dr. Kinyas KARTAL

Ankara 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ETİK KURUL DEĞERLENDİRME RAPORU	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. ANATOMİ	4
2.3. FİZYOLOJİ	6
2.4. TANI YÖNTEMLERİ	7
2.4.1. Biyokimyasal Yöntemler	7
2.4.1.1. Tiroid Fonksiyon Testleri	7
2.4.5. Tiroid Kanseri Gelişimi Ve Onkogenezi	14
2.4.6.1. Papiller Tiroid Kanseri	18
2.4.6.2. Foliküler Tiroid Kanseri	22
2.4.6.3. Hürthle Hücreli Karsinom	24

2.5. TSH VE EKAD RESEPTÖR METİLASYONUNUN TİROİD KANSERİNDEKİ ROLÜ	27
3. MATERYAL- METOD	30
3.1. DNA İZOLASYONU	32
3.2. Bİ-SÜLFİT MODİFİKASYONU	33
3.3. METİLASYON SPESİFİK POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (M- PCR)	34
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ.....	48
7. KAYNAKLAR	50

KISALTMALAR

AMA	:	Anti- mikrozomal antikor
Anti- TRH	:	TSH reseptör antikor
ATA	:	Anti- tiroglobulin antikor
ATP	:	Adenozin trifosfat
Bp	:	Baz çifti
BT	:	Bilgisayarlı Tomografi
Cm	:	Santimetre
mCi	:	Mili Küri
DIT	:	Diiyodotirozin
Dk	:	Dakika
EGF	:	Epidermal büyüme faktörü
EKAD	:	Epitelyal kaderin
FAP	:	Familyal adenomatoz polipozis koli
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü
FTC	:	Foliküler tiroid kanser
HGF	:	Hepatosit büyüme faktörü
I123	:	İyot 123
I131	:	İyot 131
IGF	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
İİAB	:	İnce iğne aspirasyon biyopsisi
M.Ö	:	Milattan önce
MIT	:	Monoiyodotirozin
Mm	:	Milimetre
MRG	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
Myc	:	Miyelosistomatozis
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
NCI	:	Ulusal Kanser Enstitüsü
Ng/dl	:	Nanogram / desilitre
NIS	:	Sodyum- İyot taşıyıcı
RAİ	:	Radyoaktif iyot
Sa	:	Saat
Sn	:	Saniye

sT ₃	:	Serbest Triiyodotironin
sT ₄	:	Serbest Tiroksin
sTSH	:	Serbest Tiroid Uyarıcı Hormon
T ₃	:	Triiyodotironin
T ₄	:	Tiroksin
TBG	:	Tiroksin bağlayan globulin
Tc99m	:	Teknesyum 99 izomeri
Tg	:	Tiroglobulin
TGF- α	:	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGF- β	:	Transforme edici büyüme faktörü beta
TPC	:	Tiroid papiller kanser
TPOAb	:	Anti- tiroit peroksidaz antikor
TSH	:	Tiroid Uyarıcı Hormon
TSHr	:	Tiroid Uyarıcı Hormon reseptörü
TSI	:	Tiroid uyarıcı immünglobulin
TT3	:	Total Triiyodotironin
TT4	:	Total Tiroksin
USG	:	Ultrasonografi

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Tiroid nodüllerinde benign-malign ayrımında kullanılan ultrasonografik kriterler	10
Tablo 2.	İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi, <i>Bethesda</i> sınıflandırma sistemi	13
Tablo 3.	Tiroid kanseri etiyolojisinde etkili faktörler.....	15
Tablo 4.	Tiroid kanseri ile ilişkili onkogenler	16
Tablo 5.	Tiroid Kanserleri	17
Tablo 6.	AMES ve AGES sistemine göre yüksek riskli hastalar.	19
Tablo 7.	MACIS skorlama sistemine göre puan hesaplanması	20
Tablo 8.	MACIS skorlama sistemine göre hastaların 20 yıllık mortalite oranları	20
Tablo 9.	TNM evreleme sistemine göre tiroid kanseri evrelemesi.....	21
Tablo 10.	Papiller tiroid kanseri tedavisinde total tiroidektominin tercih edilme sebepleri	22
Tablo 11.	Foliküler karsinomda kötü prognostik faktörler.....	24
Tablo 12.	TSHr ve EKAD gen amplifikasyonlarında kullanılan primer baz dizileri	35
Tablo 13.	Çalışmadaki hasta grupları ve gruplardaki hasta sayıları.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Tiroid bezinin anatomisi	5
Şekil 2. Psomom cisimciği.....	19
Şekil 3. Tirotiropin hormon reseptörü (TSHR).....	27
Şekil 4. E- Kaderin reseptörü (EKAD)	26

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 1.	Hasta gruplarının yüzde olarak grafiksel dağılımı	31
Grafik 2.	Hasta gruplarına göre ölçülen ortalama tiroglobulin değerleri.....	38
Grafik 3.	Hasta gruplarına göre ortalama nodül boyutları (milimetre cinsinden) .	39
Grafik 4.	Sitolojik tanılara göre hastalardaki TSHR metilasyon varlığı.....	40
Grafik 5.	TSHr'ünün metile olan ve olmayan formlarındaki hasta sayıları	40
Grafik 6.	Grup 3a ve Grup 3b'de ki hastaların TSHr metilasyon durumu.	41
Grafik 7.	Dördüncü Gruptaki hastaların TSHr metilasyon oranları	42

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Resim 1.** Çalışma sırasında kullanılan santrifuj tüpleri 33
- Resim 2.** TSHr jel elektroforez görüntüsü 36

ÖZET

GİRİŞ: Tiroid kanserlerini de içeren birçok kanser türünün onkogenezinde gen metilasyonlarının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışmada tiroid spesifik genler arasında bulunan Tiroid Uyarıcı Hormon reseptörü (TSHr) ve Epitelyal Kaderin (EKAD) reseptör genlerinde metilasyon varlığının tiroid kanseri gelişimindeki yeri araştırılmış ve tiroid nodüllerinde benign-malign ayrımının güçleştiği durumlarda TSHr ve EKAD gen metilasyonlarının klinik öneminin saptanması hedeflenmiştir.

MATERYAL METOD: 2007- 2011 yılları arasında tedavi gören 4355 nodüler guatr tanısı bulunan hasta içerisinde 76 hasta seçilmiş; ince iğne aspirasyon biyopsisi ile elde edilen sitoloji örneklerinden deoksiribonükleik asit (DNA) izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lerden metilasyon spesifik polimerize zincir tepkimesi (M- PCR) yöntemi ile TSHr ve EKAD genlerinin promotör bölgelerindeki metilasyon varlığı araştırılmıştır. Ayrıca metilasyon varlığının cinsiyet, yaş, nodül boyutu ve kan tiroglobulin düzeyi ile olan ilişkisi de incelenmiştir.

BULGULAR: Çalışma sonucunda TSHr metilasyon oranı papiller tiroid kanserli hastalarda %87,5, önemi belirsiz atipiyeye sahip hastalarda %58,1, foliküler neoplazi şüphesi bulunan hastalarda %41,7 iken benign nodüler guatrlı hastalarda ise %47,1 olarak saptanmıştır ($p<0,05$).

SONUÇ: Metilasyon varlığının kanserli hasta grubunda yüksek saptanmış olması TSHr metilasyonunun bir kanser belirteci olarak kullanılabileceği yönündeki hipotezi desteklemektedir. Mevcut bulgular ışığında TSHr metilasyon varlığının önemi belirsiz atipi ve foliküler neoplazi şüphesine sahip hasta gruplarında, benign- malign ayrımı açısından belirleyici bir faktör olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca metilasyon varlığının yaş, cinsiyet, nodül boyutu ve kan tiroglobulin düzeyi ile anlamlı bir istatistiksel bağının olmadığı saptanmıştır. Kötü prognoza sahip olduğu bilinen hastaların tümünde TSHr metilasyon varlığının saptanması prognostik bir faktör olarak TSHr metilasyonunun araştırılabileceğini göstermiştir. Hasta gruplarının hiç birisinde EKAD gen reseptör metilasyonu ile ilgili istatistiksel ve matematiksel

olarak anlamlı sonuç alınamamıştır. EKAD geni ile ilgili teknik yetersizlik nedeniyle anlamlı sonuç alınamamıştır. Bu çalışma literatürde TSHr metilasyon varlığını sitolojik olarak araştıran tek çalışmadır.

ABSTRACT

INTRODUCTION: It is determined by the researchers that tumor suppressor genes are found in methylated forms in the cancer oncogenesis of thyroid malignancies. TSH receptor and ECAD receptor genes can be classified as thyroid specific genes. In this experimental study the methylation status of these thyroid specific genes and their clinical use in the differentiation of benign and malignant thyroid nodules are investigated.

MATERIAL METHOD: Of the 4355 patients with nodular goiter, who have been treated between 2007 and 2011, 76 patients were selected. Deoxyribonucleic acids (DNA) were isolated from the cytology specimens obtained by fine needle aspiration biopsy. After isolation of the DNAs, the methylation status of TSHr and ECAD receptor promoter regions were investigated by methylation specific polymerase chain reaction (M-PCR). Also the relation between methylation status of the genes and gender, age, size of the nodules and blood thyroglobulin levels of the patients were studied.

RESULTS: The ratio of methylated TSHr was found 87,5% of patients with papillary thyroid cancer, 58,1% of patients with cytological features of atypia of undetermined significance, 41,7% of patients with suspected cytological features for a follicular neoplasm and 47,1% of patients with benign nodular goiter ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The ratio of TSHr methylation in papillary thyroid carcinoma group adduced that TSHr methylation status can be utilised as a tumor marker for papillary cancer. It is shown that the methylation status of TSHr genes have no role in determining the malignant potential for the nodules which are cytologically classified as atypia of undetermined significance and for the nodules which are cytologically found to be suspicious for a follicular neoplasm. There was no statistical discrepancy between TSHr methylation status and gender, age, size of the nodules and blood thyroglobulin levels of the patients. TSHr of patients who with poor prognostic factors for papillary thyroid cancer (9 patient) were all in methylated form. This study shows that more clinical studies are needed for searching TSHr

methylation as a prognostic factor. No significant results were determined about the ECAD receptor gene methylation. According to our knowledge this study is the first try in the medical literature which searches the TSHr methylation status from cytologically derived DNA.

1. GİRİŞ

Tiroid kanseri, tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini oluşturmaya karşın endokrin kanserler içerisinde en sık görülen kanser türüdür. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl 1 milyon hastadan 40'ı tiroid kanseri tanısı almaktadır. Bir milyon hastadan 6'sı tiroid kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (1).

Tiroid kanserlerini de içeren birçok kanser türünün onkogenezi gen metilasyonlarının önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tiroid kanserlerinde ve bazı benign tiroid hastalıklarında birçok tümör supresör genin metile formda olduğu saptanmıştır. Bazı genlerin metilasyonu belirli tiroid kanseri alt gruplarında oluşur ve bunlar spesifik sinyal ileti yolları ile ilişkilidir (2).

Tiroid spesifik genler arasında Tiroid Uyarıcı Hormon reseptör (TSHr) ve E- Kaderin (EKAD) reseptör genleri sayılabilir (2,3). TSHr tiroid bezinin gelişiminden ve fonksiyonlarından başlıca sorumlu olan reseptördür. Bu nedenle tiroid onkogenezi önemli bir role sahiptir (4,5). EKAD geninin, metastaz ve invazyon baskılayıcı rolü olduğu sanılmaktadır. EKAD geninin promotör bölgesindeki metilasyonun bu genin işlevinde fonksiyon kaybına yol açtığı düşünülmektedir (3).

Tiroid kanseri tanısında kullanılan yöntemler içerisinde en güvenilir yöntemlerden biri ince iğne aspirasyon biyopsisidir (İİAB). Radyolojik olarak malignite bulguları taşıyan veya klinik olarak kanser şüphesi bulunan olguların tanısında kullanılır. İİAB özgüllüğü %91, duyarlılık değeri ise %86'dır (1). Tiroid kanserlerinin güncel tedavisinde en sık karşılaşılan sorunlardan biri İİAB sonucunda malignite tanısı konulamayan ancak malignite açısından şüpheli bulgular taşıyan hastaların tedavisinin yönlendirilmesidir (6).

İnce iğne aspirasyon biyopsisi sonucu malignite açısından şüpheli olgular ve folliküler karsinom tanısının foliküler adenomdan ayırt edilemediği hastalarda güncel

tedavi şekli hastaların cerrahi yöntemlerle tedavi edilmesidir. Yapılan çalışmalarda İİAB sonucu malignite açısından şüpheli bulunan olguların yaklaşık %80'inde patoloji sonucunun benign olarak saptandığı gösterilmiştir (7,8,9). Bu bulgular araştırmacıları tiroid kanseri için farklı tümör belirteçleri bulmaya yönlendirmiştir.

Bu retrospektif randomize kontrollü çalışmada tiroid kanserlerinde ve tiroit nodüllerinde benign-malign ayrımının radyolojik ve sitolojik olarak güçleştiği durumlarda ayrıca folliküler adenom- karsinom ayrımının yapılamadığı hasta gruplarında tümör belirteci olarak TSHr ve EKAD gen metilasyonlarının klinik öneminin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

İlk olarak M.Ö. 4000 yılında Mısır Uygarlığı Hiyeloglif yazıt ve şekillerinde gösterilen yapıya “tiroit” ismi 1656 yılında Adenographia adlı eserinde Thomas Wharton tarafından konulmuştur. Tiroid terimi Yunanca “*kalkan şekilli*” anlamına gelen “*thyreoides*” kelimesinden köken alır (10). Tarihte ilk defa tiroid bezine cerrahi girişim Egina'lı Paulus'a göre M.S. 500' lü yıllarda gerçekleştirilmiştir (11).

Aguapendente 18.yy. ortalarında tiroid bezinin büyümesini guatr olarak adlandırmıştır. Yine bu yüzyılda Bernard Courtais tarafından tiroid glandının fizyolojisi aydınlatılmıştır. Tiroid bezinin salgı yaptığı ilk kez 1836 yılında King tarafından açıklanmıştır. Gosselin tarafından ilk kez tiroid hücresi 1862' de tanımlanmıştır. Tiroid bezinin vücudun olgunlaşması için gerekli bir endokrin organ olduğu 19.yy.'da kabul edilmiş ve insan vücudunun kadavralar üzerinde yapılan çalışmalarla endokrinolojik haritası çıkarılmıştır. Daha sonraki dönemde ise atrezik kalmış tiroid bezinin büyüme ve gelişme geriliğine sebep olduğu açıklanmıştır. Hashimoto, De Quervain ve Riedel 20 yy. başlarında, bugün de geçerli olan klasik “tiroidit” tariflerini yapmışlardır. Pary, Graves ve Basedow peş peşe hipertiroidiyi tanımlamışlardır.

Tiroid cerrahisi tarihinde en önemli isimlerden biri de, tiroid bezinin fizyopatolojisi, cerrahisi ve komplikasyonlarına medikal yaklaşım konularındaki çalışmaları ile 1909 yılında Nobel Tıp Ödülünü alan Theodor Kocher'dir. Kocher, 1912 yılına kadar 5.000'den fazla tiroidektomi ameliyatını başarı ile gerçekleştirmiştir. Başlangıçta total tiroidektomi yaptığı hastalarında miksödem oluşması üzerine subtotal rezeksiyonu uygulamıştır (10).

William Stewart Halsted tiroid hakkında yazılmış olan ilk kitabın yazarı olma özelliğini taşımaktadır. Bu kitapta tiroidektomi insizyonunu, ligasyonu ve

ektirpasyonu detaylı olarak açıklamıştır. Hipertiroidi ve tiroid kanserinin tanınması, tedavisi ve nasıl başarılı olunacağı onun ayrıntılı açıklamaları ile öğrenilmiştir. Yüzyılımızın her biri isim yapmış tiroid cerrahları olan Mayo, Lahey ve Crile için önder olmuştur (11).

Tiroid cerrahisi 19. yüzyılın ortalarına kadar %40'ın üzerinde mortalite ile yapılmıştır. Bu dönemden sonra genel anestezi, asepsi ve hemostazdaki gelişmeler ile tiroid cerrahisindeki mortalite oranları anlamlı derecede düşüş göstermiştir.

2.2. ANATOMİ

Tiroid bezi sağ ve sol olarak adlandırılan ve sıklıkla bunları birleştiren isthmustan oluşan iki loblu bir bezdir. Ortalama 20 gr ağırlığındadır. Ayrıca %80 oranında bu yapılara ilave olarak, istmustan yukarıya genellikle sola doğru uzanan ve tiroglossal kanalın kalıntısı olan piramidal lob bulunur (13,14).

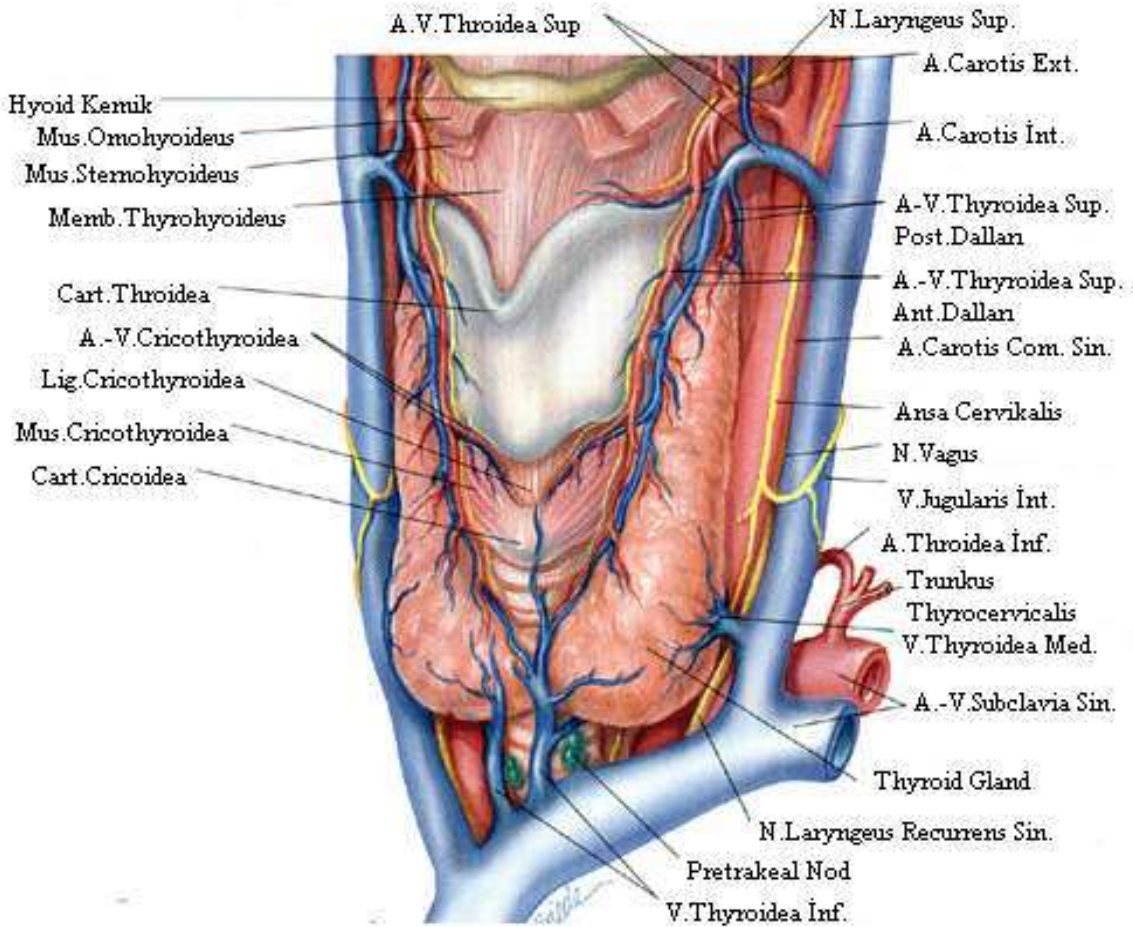
Sağ ve sol loblar trakeayı önden kısmen çevreler. Lateralinde karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası yer alır. Tiroid bezi ön tarafta yüzeyden derine doğru; deri, süperfisyel faysa, derin boyun fasyasının yüzeyel tabakası ve bu tabakanın örttüğü stenokleidomastoid, omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kasları (strap kasları) yer alır. Arka medialde ise özofagus ve trakea tarafından sınırlanmıştır (14, 15). Posterior süspansuar ligaman (Berry ligamanı) aracılığı ile krikoid kıkırdak ve üst trakeal halkalara yapışıktır (16).

Tiroid bezinin kanlanması superior ve inferior tiroid arterler aracılığıyla olur. Superior tiroid arter eksternal karotid arterin dalıdır ve hyoid kemik düzeyinden çıkıp aşağı doğru inerek tiroidin üst kutbuna girer (17).

Lenfatik kapiller bir ağ tüm tiroid folliküllerini sarar ve yüzeyel subkapsüler bir lenf pleksusuna açılır. Bu ağdan çıkan toplayıcı kanallar parakapsüler bölge, pretrakeal alan, juguler ven yanında ve rekürren laringeal sinir boyunca yerleşen ilk kademe lenf bezlerine drene olur. “*Delphian Nodu*” olarak bilinen bir nod trakeanın önünde

ve istmusun üzerinde palpe edilebilir. Bu durum sıklıkla malign hastalık veya tiroiditle birlikte görülür (17).

Tiroidin sempatik innervasyonu üst ve orta servikal sempatik ganglionlardan çıkan lifler, parasempatik innervasyonu ise vagustan çıkan laringeal sinirlerin dalları olur. Tiroid bezinin anatomisinde dikkate alınacak bir diğer husus da rekürren laringeal sinir ve superior lareneal sinir eksternal dalının tiroid ile ilişkisidir. Rekürren laringeal sinir larinksin intrinsek kaslarını innerve eder. Tiroidektomi esnasında zedelendiğinde aynı tarafta vokal kord paralizi meydana gelmektedir. Süperior laringeal sinirin eksternal dalı süperior tiroid arter boyunca seyrederek ve krikotiroid kasını innerve eder. Krikotiroid kasının fonksiyon kaybı ses tonlamasında bozulmaya ve yutma bozukluğuna sebep olabilir. Bilateral zarar gördüğünde ise sese kabalaşma ve ses yorgunluğuna sebep olur (14,17).



Şekil 1. Tiroid bezinin anatomisi (13).

2.3. FİZYOLOJİ

Tiroidin folliküler hücrelerinden tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) hormonları salgılanır. Ayrıca parafoliküler hücrelerden de kalsiyum metabolizmasında etkili olan kalsitonin salgılanmaktadır. T3 ve T4 genel anlamda bazal metabolizmayı düzenleyen hormonlardır. Hücre içinde bulunan nükleus reseptörlerine bağlanarak protein yapımını regüle ederler. Ayrıca mitokondrilerde oksidasyon olaylarını hızlandırmak, membran yapısında yer alan enzimlerin aktivitesini kontrol etmek gibi diğer fonksiyonları da vardır (18).

Tiroid bezinden T3 ve T4 sekresyonu anterior hipofizden salgılanan TSH'ın kontrolü altındadır. TSH uyarısı T3 ve T4 salınımını uyarırken, kandaki T3 ve T4'ün artışı, hipofizden TSH salınımını baskılar. TSH salınımı ise hipotalamustan salgılanan “tirotropin releasing hormonun” (TRH) kontrolü altındadır. TRH, hipotalamusun paraventriküler nükleuslarında bulunan parvosellüler nöronal sistemde yapılır. Aksonlar tarafından median eminesteki primer pleksusa taşınan bu hormon, daha sonra portal ven aracılığıyla anterior hipofize ulaşır (10, 17). TSH'ın yapımına ve salınımına etki eden birçok faktör vardır. Bunlardan TRH, alfa reseptör etkili katekolaminler ve vasopressin uyarıcı; somatostatin, dopamin ve tiroid hormonları ise baskılayıcı etkiye sahiptir.

Tiroid hormonlarının oluşumu eksojen iyot alımına bağlıdır. Follikül hücresinde tirozine bir iyot bağlanması ile monoiyodotirozin (MIT), iki iyot bağlanması ile diiyodotirozin (DIT) oluşur. İki DIT eşlendiğinde T4, bir MIT ile bir DIT eşlendiğinde T3 meydana gelir. Tiroid hormonları tiroglobuline (Tg) bağlı olarak follikül içindeki kolloidde depolanır. Bu depo vücudun 1-3 aylık ihtiyacını karşılamaya yeterlidir. T3 ve T4 tiroglobulinden ayrılarak serbest hormon şeklinde kana salgılanır ve tamamına yakını plazma proteinlerine bağlı olarak bulunurlar. Bu hormonlara bağlanma eğilimi en yüksek olan taşıyıcı protein, bir glikoprotein olan tiroksin bağlayan globulin (TBG)'dir (16).

Plazmadaki tiroid hormonlarının %0,02'si serbest haldedir ve bunlar fizyolojik olarak aktif fraksiyonu oluşturur. Tiroid bezinden salgılanan hormonun %90'ı T₄, %10'u ise T₃'tür. Bununla birlikte tiroksinin önemli bir bölümü (%75-85) kanda triiyodotironine çevrilir (T₄'ün T₃'e deiyodinasyonu). Bu çevrilme çok önemlidir çünkü T₃ plazmada 10-20 kat daha az miktarda bulunsa da T₄'ten dört kat daha aktiftir. T₃'ün yarılanma ömrü bir gün iken T₄'ün yedi gündür.

Tiroid hormonları hedef hücreye pasif diffüzyonla veya ATP bağımlı aktif transportla geçer. Daha sonra hücre çekirdeğindeki tiroid hormon reseptörlerine (TR) bağlanarak etkilerini gösterirler (17, 19).

2.4. TANI YÖNTEMLERİ

Tiroid hastalıklarında tanı için girişimsel olmayan yöntemlerden tiroid fonksiyon testleri, ultrasonografi, tiroid sintigrafisi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme kullanılırken; girişimsel yöntem olarak ise ince iğne aspirasyon biyopsisi kullanılmaktadır.

2.4.1. Biyokimyasal Yöntemler

2.4.1.1. Tiroid Fonksiyon Testleri

Tiroid bezinin fonksiyonel bozukluğu yaşla artmakla beraber, popülasyonda %5 oranında görülmektedir. Tiroid fonksiyonlarını direkt olarak yansıtan en değerli test serum tiroid hormon düzeyi veya doku hormon konsantrasyonudur. Total hormon düzeyleri tiroid fonksiyonunu çoğu zaman doğru olarak yansıtmaz. Bu nedenle tiroid fonksiyonlarını belirlemede serbest hormon düzeyleri daha güvenilirdir (20).

sTSH: Hipotalamus-hipofiz eksenini normal çalıştığı sürece TSH düzeyini, hipofizdeki tiroid hormonu etkinliği belirler ve bireylerin ötiroid durumda tutulmasını sağlar. Özellikle serbest T₄ (sT₄) düzeyindeki küçük bir değişim TSH'nın katlanarak artmasına veya azalmasına neden olur. Klinik olarak tiroid disfonksiyonu

bulunmadığını gösteren en etkin laboratuvar testi sTSH'dır. Tiroid disfonksiyon olasılığı klinik olarak yüksek olan hastalarda eğer hipotiroidizmden şüpheleniliyorsa sTSH ve serbest T4 (sT4), eğer hipertiroidizmden şüpheleniliyorsa ek olarak sT3 ya da total T3 düzeylerinin de bilinmesi gereklidir (20).

Total Tiroksin (TT4): Serum total T4 düzeyi tiroid fonksiyonunu göstermede çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Total T4 sadece T4 bağlanma anomalilerini göstermede güvenilirdir (20).

Serbest Tiroksin (sT4): Proteine bağlanmayan bu fraksiyon hücrelere girer ve burada T3'e dönüşür. Aynı zamanda tiroid hormonunun hipofizdeki negatif feed back etkisini oluşturur. Klinik hipertiroidi ya da hipotiroidi gibi fonksiyonel tiroid hastalığı bulunan ve diğer hastalıklarla komplike olmamış bireylerde, tüm sT4 testlerinin tanısal kesinliği %90-100 dolayındadır.

Total Triiyodotironin (TT3): Total T3 proteine bağlı ve serbest T3' den oluşur. T3 en çok TBG'ye bağlanır, bu yüzden TBG düzeyindeki değişiklikler tT3 değerlerinin de değişmesine neden olur. Tiroid dışı hastalıklarda da düzeyi değişebildiğinden T3 replasman tedavisindeki hastaların izlenmesinde de güvenilir bir test değildir. Ancak Graves hastalığında erken rekürrensten şüpheleniliyorsa tT3, tT4'den daha duyarlı bir testtir.

Serbest Triiyodotironin (sT3): Serbest T3 TBG düzeyindeki değişikliklerden çoğunlukla etkilenmez. İdeal ve mantıksal olarak yararlı testin sT3 olması gerekir. Ancak klinik olarak sT3 ve TT3' den hangisinin daha değerli olduğu konusu kesinleşmiş değildir.

2.4.1.2. Tiroid Otoantikoları

Tiroid bezinin kendi antijenine vücudun otoantikör oluşturması ilk kez 1956 yılında Hashimoto tiroiditi ile tanımlanmıştır. Otoimmün tiroid hastalıklarında serumda tiroid otoantikörlerinin varlığının gösterilmesi başlıca tanı yöntemidir. En sık kullanılanları antimikrozomal antikör (AMA), antitiroid peroksidaz antikörü

(TPOAb), antitiroglobulin antikoru (ATA) ve TSH reseptör antikoru (anti-TRAb)'dır.

Anti tiroid peroksidaz antikoru (TPOAb): Kronik otoimmün tiroiditli hastaların %90'dan fazlasında TPOAb'u pozitifdir. Hashimoto tiroiditinde bu oran %90- 100, Graves hastalığında ise %65-80 arasındadır. Titrenin yüksek oluşu ile tiroid fonksiyonu arasında ilişki yoktur.

Anti-TSH reseptör antikoru (Anti-TRAb): TSH reseptörüne karşı geliştiği tespit edilen bu otoantikoru önceleri uzun etkili tiroid stimülatörü (Long acting thyroid stimulator-LATS) olarak isimlendirilmiştir. TRAb'nun iki tipi mevcuttur. Bunlardan tiroid stimüle eden antikoru (TSAb) ya da tiroid stimülan immünglobulin (TSİ); Graves'li hastaların %90-95'inde yüksek saptanır. Tiroid bloke edici immünglobulin (TBAb) ise geçici neonatal hipotiroidizmi olan bebeklerin annelerinde en yüksek düzeyde saptanmaktadır.

Anti tiroglobulin antikoru (ATA): Otoimmün tiroiditlerde %60-70, Graves hastalığında ise %20-40 oranında saptanmaktadır. TPOAb ile kıyaslandığında duyarlılığının düşük olması nedeniyle klinik değeri sınırlıdır (20).

2.4.2. Radyolojik Yöntemler

2.4.2.1. Ultrasonografi

Yüksek frekanslı ses dalgalarının kullanılması ile oluşturulan bir görüntüleme yöntemidir ve bu yöntemde, sesin farklı dokularda farklı hızda yayılabilme özelliğinden faydalanılır. Tiroid ultrasonografisi dinamik bir görüntüleme yöntemi olup cihazın özellikleri ve yapan kişinin deneyimine bağlı olmakla birlikte en fazla bilgi verici radyolojik yöntemdir (21).

Ultrasonografi yöntemi, solid ve kistik lezyonları ayırmada kullanılabilir ancak benign ve malign lezyonları ayıramaz. Solid lezyonlar benign olabileceği gibi kistik lezyonlar da malign olabilir. Üç santimetrenin üzerindeki karsinomalar kistik

dejenerasyon gösterebildikleri için eko paternin bozulmasına yol açabilirler (22). Tiroid nodüllerinin benign- malign ayrımında kullanılan bazı ultrasonografik kriterler Tablo 1.'de sıralanmıştır (21).

Yüksek rezolüsyonlu ultrasonografi ile 1 mm'e kadar küçük nodüller bile saptanabilmektedir. Bu yöntem ile pek çok kistik lezyonun hakiki kist olmadığı, solid doku içerdiği ve karışık eko paterni verdiği görülmüştür (22).

Tablo 1. Tiroid nodüllerinde benign-malign ayrımında kullanılan ultrasonografik kriterler (21).

Özellik	Benign	Malign
Nodül ekosu	Hiperekojen	Hipoekojen
Nodül konturları	Düzensiz	Düzensiz
Periferik halo	Düzensiz- ince	Düzensiz
Mikrokalsifikasyon	%3 -5	%80- 90
Makrokalsifikasyon	Var	Yok
İçeriği	Koloidal	Soliter
Çevre Doku İnvazyonu	Yok	Var
Servikal Lap (met.)	Yok	Var
Neovaskülarite	Periferik	Santral

2.4.2.2. Bigisayarlı Tomografi (BT)

Bilgisayarlı tomografi özellikle tiroid bezinin konjenital anomalilerini ortaya koymada avantajlı bir tekniktir. Ayrıca tiroid kanserlerinin çevre dokulara invazyon derecesinin belirlenmesinde, retrosternal ve planjon guatrların tanısında da kullanılmaktadır.

2.4.2.3. Manyetik Rezonans Görünteleme (MRG)

Manyetik rezonans görüntüleme tiroid kanserli hastalarda servikal lenf nodularının değerlendirilmesinde önemli fayda sağlamaktadır. Multiplanar ve geniş görüntüleme sağlaması önemli avantajıdır (21).

2.4.3. Tiroid Sintigrafisi

Tiroid sintigrafisi tiroid bezinin hem fonksiyonel durumunu hem de morfolojik özelliklerini ortaya koyması bakımından özellikle hipertiroidi olgularında vazgeçilemeyecek bir tanı aracıdır (23,24).

Tiroid sintigrafisinde en sık kullanılan I131, I123 ve Tc99m perteknetat izotopları nodülleri iyot tutma yeteneklerine göre sınıflandırır. I123 veya Tc99m izotopları, I131'den daha az radyasyona neden olduğundan tercih nedeni olmaktadır. Normal bir tiroid sintigrafisinde verilen izotop tiroid parankiminde global olarak homojen bir dağılım gösterir. Radyoaktif izotopu hiç tutmuyorsa soğuk nodül, radyoaktif izotopu etraf tiroid dokusu kadar tutuyorsa ılık nodül, ve radyoaktif izotopu etraf tiroid dokusundan daha fazla tutuyorsa sıcak nodül şeklinde yorumlanmaktadır (22).

Sintigrafi benign nodülleri malign olanlardan ayıramaz ve sadece nodülün fonksiyonel durumuna dayanarak malign hastalık olasılığını tayin etmede kullanılabilir. Ashcraft ve Van Herle'nin çalışmalarında malignite soğuk nodüllerin %16'sında, sıcak nodüllerin %4'ünde bulunmuştur. Böylece soğuk nodüller daha çok malignite olasılığına sahip iken sıcak nodüllerde de malignite riski tamamen ortadan kalkmış değildir (22).

Tiroid sintigrafisi yorumlanırken hastanın anamnezinin, muayene bulgularının, varsa tiroid hormon değerlerinin ve USG sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi en sağlıklı sonucun elde edilmesini sağlayacaktır.

2.4.4. İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi

Tiroid dokusundan ince iğne aspirasyon biyopsisi ilk olarak 20.yy'ın ortalarında tanımlanmış, ancak yaygın olarak klinik uygulamaya 1970'li yılların ikinci yarısından itibaren girmiştir. İnce iğne aspirasyon biyopsisinde amaç, 0.7 mm'den daha küçük çaplı iğnelerle hedef kitledeki hücreleri ya da çok küçük doku parçalarını iğne lümeni ve iğnenin enjektörle birleştiği şeffaf bölümünün içine almaktır.

İnce iğne aspirasyon biyopsisi ile yapılan sitolojik analizin doğruluğu, biyopsiyi ve sitolojik incelemeyi yapan hekimin deneyimine göre %50 ve %97 arasında değişmektedir. Deneyimin artması ile uygun sitolojik yorum için yeterli materyal elde etme problemi azalır ve tatminkar aspirasyon, nodüllerin %97'sinde yapılabilir hale gelir. Özellikle 4cm'den büyük ve 1 cm'den küçük nodüllerin aspirasyonunda güçlük yaşanmaktadır. Dört santimetreden büyük nodüllerden alınan sıvı epitelyal komponenti her zaman temsil etmezken; 1'cmden küçük nodüller de ise işlem nodülün boyutunun küçük olması nedeniyle teknik olarak zordur. Amerikan Ulusal kanser enstitüsü (NCI) İİAB'nden elde edilen sonuçların sitolojik ve morfolojik olarak değerlendirilmesi için Bethesda sınıflandırma sistemini oluşturmuştur. Bu sınıflandırma sistemi ile İİAB sonuçları evrensel sınıflandırma sistemine sahip olmuştur (25). İlgili sınıflandırma sistemi Tablo 2'de şematize edilmiştir.

Tablo 2. İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi, *Bethesda* sınıflandırma sistemi (25).

<p>I. Diyagnostik olmayan veya Yetersiz</p> <p>Sadece kist içeriği</p> <p>Aselüler spesmen</p> <p>Diğer (Kan, artefakt, vb)</p>
<p>II. Benign</p> <p>Benign Foliküler Nodül</p> <p>Lenfositik tiroidit</p> <p>Granülamatöz Tiroidit</p> <p>Diğer</p>
<p>III. Önemi belirsiz Atipi veya Önemi belirsiz foliküler lezyon</p>
<p>IV. Foliküler neoplazm veya Foliküler Neoplazi şüphesi</p>
<p>V. Malignite Şüphesi</p> <p>Şüpheli papiller karsinoma odağı</p> <p>Şüpheli medüller karsinom odağı</p> <p>Şüpheli metastatik karsinom odağı</p> <p>Şüpheli lenfoma odağı</p> <p>Diğer</p>
<p>VI. Malign</p> <p>Papiller Tiroid kanser</p> <p>Kötü diferansiye tiroid kanser</p> <p>Medüller tiroid kanser</p> <p>Diferansiye olmayan tiroid kanseri (anaplastik)</p> <p>Skuamoz hücreli kanser</p> <p>Metastatik Kanser</p> <p>Non- Hodgkin lenfoma</p> <p>Diğer</p>

İnce iğne aspirasyon biyopsisine göre şüpheli veya ara grupta olan lezyonları değerlendirecek etkili bir metod bulunamamıştır. Kalın iğne biyopsisinin, ince iğne biyopsisi kadar doğruluk oranı vardır, fakat komplikasyon oranları daha fazladır. İnce iğne biyopsisine göre ara grup olan lezyonların kalın iğne ile yeniden biyopsisi bazen daha kesin tanıya götürür. Kalın iğne biyopsileri büyük nodüllerde yararlı olabilir, fakat kalın iğne kullanımıyla bile, hiperselüler adenoma ile düşük dereceli karsinomayı ayırmak sıklıkla mümkün değildir (22).

Şüpheli lezyonların değerlendirilmesindeki zorluk, benign Hurthle hücreli veya Folliküler neoplazmları malign formlarından ayırmadaki problemi de yansıtmaktadır. Genel olarak tüm şüpheli nodüllerin cerrahi olarak eksizyonu önerilmektedir, çünkü halen malign nodülleri benign nodüllerden kesin olarak ayırt edebilen bir tanı yöntemi mevcut değildir (22).

İnce iğne aspirasyon biyopsisinde yalancı negatif sonuç alınmasını sağlayan faktörler; kanserin İİAB yapılan nodül dışından kaynaklanması, nodülün 3 cm den büyük olması ya da kistik dejenerasyon gösteren nodülde örneğin solid komponentten alınmamış olması olarak sıralanabilir. Yapılan bir çalışmada 3 cm ve daha büyük nodüllerde, mikst nodüllerde ve 4 cm'den büyük kistlerde İİAB'nin %25-30 yalancı negatiflik oranı olduğu bildirilmiştir.

2.4.5. Tiroid Kanseri Gelişimi Ve Onkogenezi

Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin kanserlerdir. ABD'de 1996 yılında yaklaşık 15.600 yeni kanser olgusu saptanmış olup 1.200 hasta tiroid kanserinden ölmüştür (26). Amerikan erişkin popülasyonun %47'sinde klinik olarak belirgin tiroid nodülü vardır. Ancak bu nodüllerin çoğu benign'dir ve bu nodüllerde malignite gelişme oranı yaklaşık %5'dir (27).

Tiroidin malign tümörlerinde etiyolojik ajan olarak etkisi gösterilmiş tek faktör radyasyon maruziyetidir. Radyasyon maruziyeti dış bir kaynaktan olabileceği gibi iyotun oral yolla alımı ile de olabilmektedir. Dışarıdan kaynaklanan radyasyon nükleer bomba ve kazalardan veya baş- boyun bölgesine radyoterapi uygulanmasından kaynaklanabilmektedir. Radyasyon maruziyeti sonrası gelişen malign tümörlerin hemen

tümü papiller karsinom tipindedir. Günümüzde görülen tiroid kanserlerinin yaklaşık olarak %10'unda radyasyon öyküsü mevcuttur (28).

Kadınlarda tiroid kanserlerinin daha fazla görülmesi nedeniyle seks hormonları suçlanmaktadır. Kadın/Erkek oranı pubertede en fazla iken menapoza doğru giderek azalmaktadır. Bu da seks hormonlarının tiroid kanseri onkogeneğinde etkili olabileceğini göstermektedir. Erken menapoz, oral kontraseptif kullanımı, ilk doğumun geç yaşta olması tiroid kanseri riskini arttırmaktadır (28).

Tiroid kanserinin diğer kanserler ile birlikteliği ise genetik yatkınlığı düşündürmektedir. Vucutta birçok organda hamartomlarla karakterize olan Cowden hastalığı ile tiroid malignansilerin birlikteliği sık olarak görülmektedir. Ayrıca Familial Adönomatöz Polipozis Koli (FAP)'li hastalarda normal popülasyona göre tiroid kanseri 100 kat daha sık görülmektedir (28). Tiroid kanseri etiyojisinde sayılabilecek olan diğer diğer risk faktörleri Tablo 3'te sıralanmıştır.

Tablo 3. Tiroid kanseri etiyojisinde etkili faktörler

- Radyasyon
- Diyetle iyot eksikliği
- Coğrafi bölge (İzlanda, Hawaii, volkanik bölgeler)
- Guatrojenler (kimyasal, diet)
- Daha önce varolan tiroid hastalıkları (Koloidal nodüler guatr, Graves hastalığı, Hashimoto tiroiditi)
- Daha önce tiroid ameliyatı geçirmiş olmak
- İlaçlar (fenobarbital, difenoksilat, griseofulvin, bisacodil, spironolakton, oral kontraseptifler, prolaktin inhibitörleri, östrojen preparatları)
- Yaş (genç orta yaşta insidans yüksek)
- Cinsiyet (kadınlarda insidans yüksek)
- Irk (Yahudiler)
- Aile öyküsü
- Obezite
- Multiparite
- Alkolizm
- Meme kanseri öyküsü
- Gardner sendromu, Cowden hastalığı, FAP
- Paratiroid adenomu

Tiroidin büyümesi TSH hormonu ve büyümeyi stimüle eden diğer maddelerin etkileri ile gerçekleşmektedir. Bu büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α), insüline benzer büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF)'dür. Büyümeyi inhibe eden ise transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β)'dir. Tiroiddeki büyüme bütün bu faktörlerin etkilerinin toplamı ile meydana gelmektedir.

Büyüme faktörlerinin çoğu hücre dışı uyarılardır. Bu uyarılar sonrasında bir dizi hücre içi sinyal iletim sistemi aktive olur ve hücre büyümesi değişik yollar sayesinde aktive edilir. Hücre sinyal iletim yollarında oluşan değişiklikler hücre büyümesini uyaracak ve aşırı hücre büyümesine sebebiyet vereceklerdir. Bu aşırı hücre büyümesi ve çoğalması malignite ile sonuçlanacaktır.

Hücre içi sinyal iletim yollarında protoonkogenler görev almaktadır. Protoonkogenlerin mutasyonları sonucu ise onkogenler oluşur. Oluşan bu onkogenler hücre çoğalmasını aktive ederek kontrolsüz hücre bölünmesine ve kanser oluşumuna yol açmaktadırlar. Tiroid kanseri onkogenezinde rol alan başlıca onkogenler Tablo 4 de gösterilmektedir.

Tablo 4. Tiroid kanseri ile ilişkili onkogenler

Papiller tiroid karsinomu	Ret /PTC, c-met, H-ras, trk, myc, fos
Foliküler tiroid karsinomu	K-ras, myc, fos
Medüller tiroid karsinomu	Ret, Ret / MTC
Anaplastik tiroid karsinomu	P53

2.4.6. Tiroid Kanserleri

Tiroid kanserleri, indifferansiyel/ kötü diferansiyel (anaplastik) ve diferansiyel/ iyi diferansiyel (papiller, foliküler, Hürthle hü.) karsinomlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Papiller, foliküler ve Hürthle hücreli karsinomlar primitif dokulardan kaynaklanırlar. Bu dokular tiroksin ve triiyodotironin yapımından sorumludurlar. Medüller karsinomlar nöral krestten kaynaklanırlar. Mikst papiller-foliküler

karsinomlar ve papiller karsinomun foliküler varyantı, papiller kanserler içinde sınıflandırılır. Tiroid kanserlerinin sınıflandırması Tablo 5'te gösterilmiştir. Bu çalışmada diferansiye tiroid kanserleri araştırıldığından dolayı papiller, foliküler ve Hürthle hücreli tiroid karsinomlarından bahsedilecektir.

Tablo 5. Tiroid Kanserleri (29)

<p>Papiller karsinom %80-90</p> <ul style="list-style-type: none"> - Klasik tip %70-75 - Foliküler varyant %8-13 - Uzun hücreli (Tall cell) %12 - Hürthle hücreli (Oksifilik) %2 - Diffüz sklerozan - Şeffaf hücreli (Clear cell) - Kolumnar hücreli - Solid trabeküler
<p>Foliküler karsinom %5-15</p>
<p>Hürthle hücreli karsinom %0.4-10</p>
<p>Medüller karsinom %3-5</p> <ul style="list-style-type: none"> - Klasik tip - Medüller-foliküler tip
<p>İndiferansiye (anaplastik) karsinom</p> <ul style="list-style-type: none"> - İgşi hücreli - Dev hücreli - Küçük hücreli - İnsüler karsinom - Kolumnar hücreli karsinom - Mukoepidermoid karsinom - Müsinöz karsinom
<p>Lenfoma %1-2</p>
<p>Teratom</p>
<p>Karsinosarkom</p>
<p>Fibrosarkom</p>

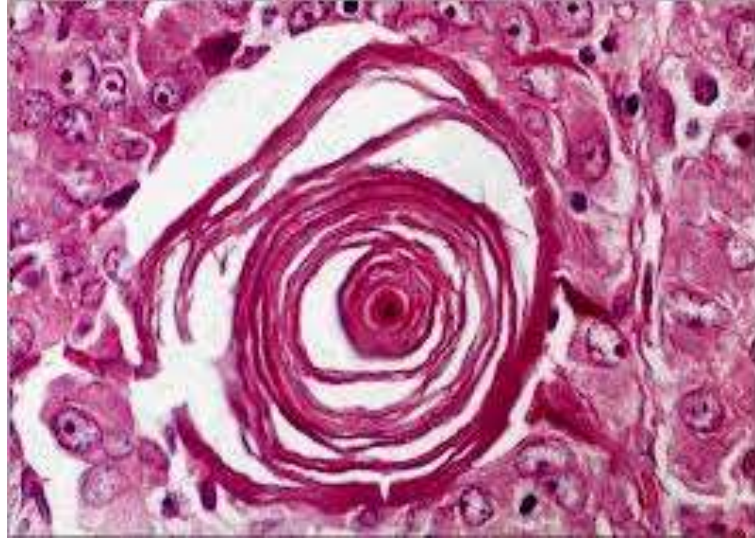
2.4.6.1. Papiller Tiroid Kanseri

Tiroid folliküler hücrelerinden köken alan, iyot tutma yeteneğini koruyan, TSH ile uyarılabilen, tiroid hormonu ve tiroglobulin sentezleyen karsinomlardır. Bütün tiroid kanserlerinin %80-90'ını oluşturmaktadırlar. Yaş grubu olarak genç (20-40 yaş) insanlarda görülme eğilimindedir. Oldukça yavaş gelişir ve yavaş seyirlidir. İyi bir prognoza sahip olan tiroid kanserleri grubundandır.

Papiller tiroid kanserli olguların büyük bir bölümünde tiroitte tek, ağrısız nodül vardır. Ancak %20 olguda birden çok nodül saptanır. Papiller kanserli olguların küçük bir bölümü servikal lenfadenopati ile karsımıza çıkar, ancak genellikle klinik inceleme ve görüntüleme yöntemleri ile tiroide nodül saptanır. Çok az olgunun ilk belirtisi uzak metastazdır. Papiller kanserde uzak metastazların çoğu akciğere olmakta (%5) ve genellikle geç dönemlerde ortaya çıkmaktadır. Tiroidit belirtileriyle başvuran hastalar arasında tiroid kanseri tanısı alan olgular da tanımlanmıştır. Tanı sırasında primer papiller kanserlerin büyüklüğü klinik okült tümörlerden, trakea ve özefagusta belirgin itmeye sebep olan dev boyun kitlelerine kadar değişebilir. Çoğunlukla 1-4 cm çaplı bir intratiroidal tümör saptanır ve tiroid dışı yayılım yoktur. Tanı sırasında %5 olguda ses kısıklığı olduğu bildirilmektedir (32). Ancak tiroid kanserleri birçok başka kanser gibi giderek daha erken tanı almakta ve tiroid dışı yayılıma günümüzde daha az rastlanmaktadır. Çocuklarda papiller tiroid kanseri tanısı konduğunda %90 servikal lenf düğümü, %20 akciğer metastazı bulunmaktadır (33).

Papiller karsinomun makroskopik olarak 3 tipi bulunmaktadır. 1 cm'den küçük ve lokal invazyon bulguları olmayan tümörlere okült veya mikrokarsinom adı verilir. 1 cm'den büyük, intraTiroidal ve lokal invazyon bulgusu olmayan tümörlere intraTiroidal; lokal olarak ilerlemiş, kapsül invazyonu olan tümörlere ise ekstratiroidal tiroid karsinomları adı verilir.

Papiller kanserin mikroskopisinde büyük veziküller arasında düzensiz nükleuslu yapılar vardır. Papiller karsinomlarda %40-50 oranında, papillaların fibrovasküler stroma bölgelerinde "Psammom cisimcikleri" olarak adlandırılan kalsifikasyonlar bulunur (28,30). Psammom cisimciklerinin görülmesi papiller tiroid kanseri açısından patognomiktir (Şekil 2). Ayrıca kromatinin dizilimi nedeniyle bazı hücre nükleusları şeffaf gözüktür. Bu görünüme sahip hücreler "Orphan Annie" hücreleri adını alır (28).



Şekil 2. Psammom cisimciği (31).

Papiller karsinomlar genellikle yavaş seyirli ve prognozu iyi olan tümörlerdir. Otuz yıllık mortalite oranı %6 civarındadır. Otopsi serilerinde daha sık rastlanması da benign seyirli bir tümör olduğununun bir başka göstergesidir. Papiller karsinom geniş spektrumlu bir hastalık olduğundan prognozunu belirlemede değişik prognostik skorlama sistemleri geliştirilmiştir.

Lahey Clinic tarafından 1988 yılında oluşturulan AMES skorlama sisteminde hastanın yaşı (Age), metastaz varlığı (Metastasis), tümörün yayılımı (Extent) ve boyutu (Size) kullanılarak hastalığın prognozu belirlenmeye çalışılmıştır. Mayo Clinic tarafından 1987 yılında planlanan AGES skorlama sisteminde ise yaş (Age), hastalığın evresi (Grade), tümörün yayılımı (E), ve boyutu (Size) prognostik parametreler olarak seçilmiştir. AMES ve AGES skorlama sistemine göre kötü prognoza sahip olan hastalar Tablo 6’da gösterilmiştir (28).

Tablo 6. AMES ve AGES sistemine göre yüksek riskli hastalar.

Kriter	AMES	Kriter	AGES
Yaş	Kadın > 50	Yaş	Kadın >50
	Erkek > 40		Erkek >40
Metastas	Uzak metastazı olanlar	Grade	Kötü diferansiye
Yayılım	Kapsül invazyonu +	Yayılım	Komşu doku invazyonu
	Ekstratiroidal yayılım +		Uzak metastaz
Boyut	> 5cm	Boyut	> 4cm

Bir başka prognostik skorlama sistemi ise MACIS (Metastasis, Age, Completeness of resection, Invasion, Size)'tir. Bu skorlama sisteminde parametrelere puan verilerek toplam puana bakılmaktadır. Total skor hesaplaması tablo 7'de gösterilmiştir. Tablo 8'de total skora göre hastaların 20 yıllık mortalite oranları gösterilmektedir.

Tablo 7. MACIS skorlama sistemine göre puan hesaplanması

3.1 (yaş <39 ise), 0.08×yaş (yaş >40 ise) +0.3 × tümör çapı cm
+1 (tam rezeksiyon yok ise)
+1 (lokal invaziv ise)
+3 (uzak metastaz var ise)

Tablo 8. MACIS skorlama sistemine göre hastaların 20 yıllık mortalite oranları

Grup	Skor	20 yıllık mortalite
1	<6.0	0.9
2	6.0- 6.9	11.3
3	7.0- 7.9	44.4
4	>8.0	76.5

Tiroid kanserleri sınıflandırmasında bir diğer evreleme sistemi TNM evreleme sistemidir. Bu sistemde hastalığın evresi arttıkça prognoz daha da kötüleşmektedir. TNM evrelemesi Tablo 9'da gösterilmiştir (28).

Tablo 9. TNM evreleme sistemine göre tiroid kanseri evrelemesi

Papiller veya folliküler				
<45 yaş				
■ Stage I	Herhangi T	Herhangi N	M0	
■ Stage II	Herhangi T	Herhangi N	M1	
≥45 yaş				
■ Stage I	T1	N0	M0	
■ Stage II	T2	N0	M0	
■ Stage III	T3	N0	M0	
	T1	N1a	M0	
	T2	N1a	M0	
	T3	N1a	M0	
■ Stage IVA	T4a	N0	M0	
	T4a	N1a	M0	
	T1	N1b	M0	
	T2	N1b	M0	
	T3	N1b	M0	
	T4a	N1b	M0	
■ Stage IVB	T4b	Herhangi N	M0	
■ Stage IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1	

Tx: primer tümör saptanamadı

T0: primer tümör yok

T1: tümör < 2cm

T2: tümör 2- 4 cm arasında

T3: tümör > 4 cm

T4: çevre doku invazyonu var

N: lenf nodu metastazı

Nx: lenf nodu metastazı saptanamadı

N0: komşu lenf nodu metastazı

N1: servikal/ mediastinal lenf nodu metastazı

M: uzak metastaz

Mx: uzak metastaz varlığı saptanamadı

M0: uzak metastaz yok

M1: uzak metastaz var

Papiller tiroid kanserlerinin tedavisi cerrahi olarak yapılmalıdır. Lezyon eğer tek tiroid lobunda ise eski araştırma ve kaynaklara göre istmusuda içine alan tek taraflı lobektomi yeterli bulunmakta idi. Ancak yeni yapılan çalışmalarda asıl lezyonun karşı tarafında bulunan lobda da mikrokanser görülme olasılığı %85 olarak bulunmuştur. Russel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda papiller kanserlerde birden çok odakta kanser görülme oranını %87.5 olarak bulunmuştur(34). Literatürde multifokalite ile ilgili olarak %20 ile %88 arasında oranlar verilmektedir (35). Papiller tiroid kanserlerinde total tiroidektomi prosedürünün seçilmesinin diğer sebepleri tablo 10'da sıralandırılmıştır.

Tablo 10. Papiller tiroid kanseri tedavisinde total tiroidektominin tercih edilme sebepleri

✓ Papiller karsinomlarda tümörün multisentrik olma eğiliminin fazla olması
✓ Kemik metastazlarını saptamada radyoaktif iyot ile tüm vücut taraması yapılabilmesi
✓ Kalan tiroid dokusundaki mikroskopik kanser odaklarından indifferansiye kanser gelişim riski
✓ Tiroglobulinin hastalığın seyrinde bir belirteç olarak kullanılabilmesi
✓ Radyoaktif iyot dozunun terapötik olarak azaltılması

Cerrahi sonrasında, kalan dokunun ablasyonu amaçlı; nüks ve mortaliteyi azaltmak için ayrıca süregen hastalığı olanlarda tedavi amaçlı radyoaktif iyot (RAI) tedavisi yapılır. Radyoaktif iyot tedavisi, cerrahi sonrasında 4-6. haftadan itibaren uygulanabilir. Remnant doku ablasyonu amacıyla genellikle 100 mCi RAI verilmektedir. Vasküler invazyon, tiroid dışı yayılım, lenf nodu metastazı ya da uzak metastaz varlığında 150-200 mCi dozları seçilebilir (36).

2.4.6.2. Foliküler Tiroid Kanseri

Foliküler tiroid karsinomu (FTC), diferansiye tiroid kanserlerinden biri olup folikül epitelinden köken alır. Tüm tiroid kanserleri arasında papiller tiroid karsinomundan sonra ikinci sıklıkta ve %5-15 gibi bir oranda görülür (37, 38). Foliküler karsinom sıklıkla 5. dekatta görülmektedir. Kadınlarda erkeklere oranla 3 kat daha fazla rastlanılır. İyot eksikliği olan bölgelerde görülme sıklığı artmıştır. Genellikle kapsüllü ve iyi sınırlanmış, soliter karsinom odakları olarak saptanır. İnvaziv formunda kapsül ve çevre doku invazyonu gözlenebilir (28, 37, 38).

Foliküler karsinoma İİAB ile tanı konulması oldukça zordur. Foliküler bir lezyona karsinom tanısı konulabilmesi için kapsül invazyonu veya damar invazyonu varlığının gösterilmesi gerekmektedir. İİAB ile invazyon varlığı gösterilemediğinden

foliküler adenom veya karsinom ayrımı yapılamaz ve lezyon patolojik tarafından foliküler neoplazm olarak tanımlanır.

Klinik olarak hastalar genellikle ötroittir. Tüm tiroid karsinomlarında olabileceği gibi bazen sıcak bir nodülde de foliküler karsinom saptanabilir. Multinodüler guatr nedeni ile opere olan hastaların patoloji raporlarında insidental olarak foliküler karsinom gözlenebilir. Büyük boyutlara seyrek olarak ulaştığı için genellikle fizik muayene bulgusu vermez. Ayırıcı tanıda adenom ile karsinom ayrımı yapılmalıdır.

Eğer mikroskopik olarak az da olsa papiller yapılar varsa, optik olarak şeffaf nükleuslar (Orphan Annie nükleusu) bulunuyorsa ve bu görünüme psammoma cisimleri eşlik ediyorsa bu varyasyonun adı papiller tiroid karsinomunun foliküler varyantıdır. Bu tümörler papiller tiroid karsinomu gibi seyrederler.

Lenf nodu metastazı nadirdir (%10). Lenf nodu metastazı saptandığında papiller karsinomun foliküler varyantı olabileceğinden daha ayrıntılı bir inceleme gerekir. Foliküler karsinomun yayılımı daha çok vasküler yolla olduğundan uzak metastaz yapma ihtimali daha yüksektir. Foliküler karsinom saptanan hastaların ilk tanı anında %50'sinde kemik, akciğer ve karaciğer metastazları saptanabilmektedir.

Foliküler karsinomlarda prognoz papiller tiroid kanserine göre daha kötüdür. Başlıca kötü prognostik faktörler tanı sırasında uzak organ metastazı, yaşın elliden fazla olması ve belirgin damar invazyonu bulunmasıdır. Bu faktörlerden en çok birini taşıyan tümörler düşük riskli tümörler olarak kabul edilir. Bu tümörlerde 5 yıllık mortalite %1, 20 yıllık mortalite ise %14'dür. Oysa bu faktörlerden 2 veya daha fazlasını içeren tümörlerde (yüksek riskli tümörler) 5 yıllık mortalite %53, 20 yıllık mortalite oranı ise %92'dir. Foliküler karsinomda kötü prognostik faktörler Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Foliküler karsinomda kötü prognostik faktörler

Uzak organ metastazı	İleri yaş (>50)
Cinsiyet	Belirgin damar invazyonu
Lenf düğümü metastazı	Yüksek tümör grade
Multifokalite	Büyük tümör(>5cm)
Anöploidi	Tiroid kapsül infiltrasyonu
Çevre doku infiltrasyonu	

Foliküler karsinom tedavisinde düşük riskli olan gruplarda ve kapsül invazyonu sadece birkaç noktada olan olgularda tek taraflı lobektomi ve istmektomi tercih edilebilir. Bunun için hastanın 35 yaşından genç olması, tümör çapının 1 cm' den az olması ve sadece minimal kapsül invazyonunun bulunması gereklidir. Bu saydığımız kriterlere uymayan diğer tüm hastalara uygulanacak tedavi total tiroidektomi olmalıdır. Aşık lenf nodu metastazı saptanan hastalarda lenf nodu disseksiyonu yapılır (28,37).

Herhangi bir endikasyonla ilk ameliyatında subtotal tiroidektomi yapılan hastalarda foliküler tiroid karsinomu saptandığında, yaş, tümör büyüklüğü ve invazyon derecesi gibi prognostik faktörler gözden geçirilmelidir. Eğer tümör 1 cm.'den daha büyük ise, damarı invazyonu mevcut ise, kapsüller tutulum varlığı da saptanmışsa tamamlayıcı tiroidektomi endikasyonu konulmalıdır. Özellikle erkeklerde 50 ve kadınlarda 55 yaş üzerinde, tümör çapı 3 cm.' den büyükse tamamlayıcı tiroidektomi yapılmalıdır. Uzak metastazla başvuran hastalarda mutlak endikasyon total tiroidektomidir. Metastazlara yapılabiliyor ise metastatektomi yapılmalıdır (39).

2.4.6.3. Hürthle Hücreli Karsinom

İyi diferansiye tiroid kanserlerindedir. Foliküler karsinomdan daha kötü prognozludur. Bütün diferansiye tiroid kanserlerinin %0.4 ile %10'unu oluşturur (40). İnsidansı düşük olduğundan klinik davranışı hakkında karar vermek zordur.

Hürthle hücrelerinin TSH reseptörlerinin olması, tiroglobülin salgılaması ve benign tiroid hastalıklarında da görülüyor olması nedeniyle foliküler hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lenf nodlarına metastazın daha fazla olması (40), radyoaktif iyotu daha az tutması (%10) ve daha agresif seyretmesi nedeniyle foliküler kanserlerden ayrılmaktadır. Ayrıca foliküler kanserlerin daha çok soliter görülmesine karşın Hürthle hücreli karsinomlar %30 oranında multifokal olarak saptanabilirler. Ayrıca Hürthle hücreli karsinomun anaplastik karsinoma transformasyonu diğer diferansiye tiroid kanserlerine oranla daha fazladır (28).

Hürthle hücreleri, genellikle büyük, poliglona ve granüler sitoplazmalı eosinofilik hücrelerdir. Bu hücrelerin pleomorfik, hiperkromatik nükleusları ve bol mitokondrileri vardır. Hürthle hücreli kanserde, benign hürthle neoplazmlarına göre daha çok kolumnar ve uzun küboidal hücreler vardır. Hürthle hücreli kanserin büyüme şekli genellikle trabeküler ya da solid yapıda olup, folliküler ve papiller şekilde de olabilir.

Hürthle hücreleri adalar şeklinde, Hashimoto tiroiditi, Graves hastalığı veya multinodüler guatrı beraber olabileceği gibi, benign ya da malign enkapsüle neoplazmlar şeklinde de olabilir. Hürthle hücreli kanser olgularının yaklaşık üçte birinde papiller karsinom ve non malign tiroid lezyonları birlikte olabilir.

Hürthle hücreli neoplazm denebilmesi için, neoplazmın enkapsüle olması ve tümör hücre popülasyonunun %75'inden fazlasını Hürthle hücrelerinin oluşturması gereklidir. Tiroidit, Graves hastalığı veya multinodüler guatrı tiroid dokusunda Hürthle hücrelerinin bulunması, eğer kapsül yok ise gerçek neoplazm olmadığı, sadece Hürthle hücreye değişim olduğunu gösterir.

Makroskopik kesitlerde Hürthle hücreli kanserler sıklıkla homogen, esmer, sert görünümde olup bazen nekrotik odaklar içerir. Baş ve boyun bölgesine radyasyon öyküsü olan hastalara karsinomun multifokal olarak görülmesi daha sıktır. Tümör çapı genellikle 4-5 cm'dir, ancak literatürde çapı 0.2 cm'den 12 cm'ye kadar olan vakalarda bildirilmiştir.

Hürthle hücreli karsinomu olan hastaların %90'nından fazlası boyunda kitle şikayeti ile hekime gelir (40). Çok az hastada disfaji, ses bozukluğu gibi lokal semptomlar olabilir. İlerlemiş kanserli hastalarda seyrek olarak santral hava yolu veya özefagusta obstrüksiyon olabilir. Hürthle hücreli karsinom, daha çok 50-70 yaşları arasında görülür. Kadınlarda erkeklere oranla daha sıklıkla görülmektedir. Hastaların ortalama %25'inde, ilk başvuru esnasında servikal ya da mediastinal lenf bezi metastazı saptanır. %5 hastada ise uzak metastaza ait klinik belirtiler vardır.

Hürthle hücreli karsinomu olan hastaların yaklaşık %34'ünde uzak metastaz ortaya çıkmaktadır. Bu oran, diğer iyi differansiye tiroid kanserlerinden oldukça yüksektir. Tiroid papiller kanseri gibi diğer tiroid neoplazmları ile beraber görülebilir. Özellikle bu durum boyuna radyasyon alan hastalarda daha fazla görülmektedir. Uzak metastazlar en çok akciğer ya da kemiğe olup, karaciğer, adrenal bez, santral sinir sistemi, göz ve hatta ince bağırsaklarda bile metastaz saptanabilir.

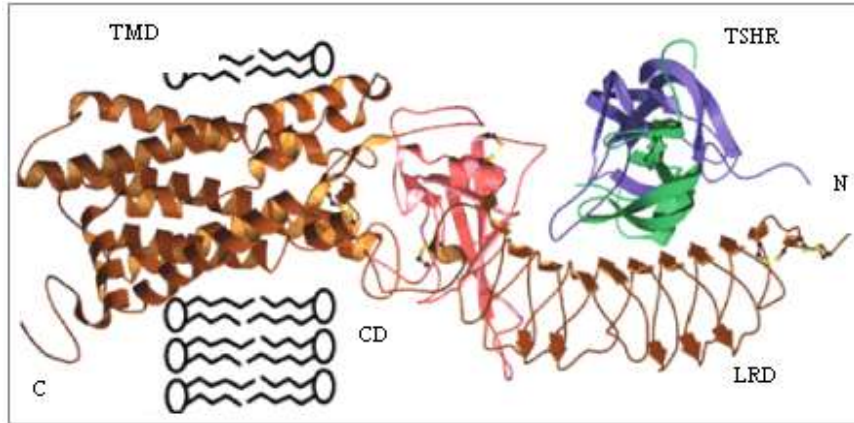
Tanıda en sık kullanılan yöntem İİAB'dir. İİAB yaymasında iri nükleus, belirgin nükleer plemorfizm bulunması, makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinin olmaması veya çok az görülmesi Hürthle hücreli neoplazmları, Hürthle hücreli değişikliklerden ayırt edebilir.

Hürthle hücreli karsinomların tedavisi cerrahidir. Hürthle hücreleri radyoaktif iyotu az tuttuğundan RAI tedavisinin başarısı oldukça düşüktür. Akciğer veya karaciğer metastazlarının varlığında eksternal radyoterapi palyatif tedaviye eklenebilir. Hürthle hücreli karsinomların tedavisinde kemoterapinin yeri yoktur. Tiroglobulin salgıladıklarından rekürrensleri tiroglobulin düzeyi ile takip edilebilir. Prognozu diğer diferansiye tiroid karsinomlarına göre daha kötüdür. 10 yıllık yaşam %65 olarak bildirilmiştir. Diğer diferansiye tiroid karsinomlarındaki gibi belirlenmiş prognostik faktörlere sahip değildir (28).

2.5. TSH VE EKAD RESEPTÖR METİLASYONUNUN TİROİD KANSERİNDEKİ ROLÜ

Tiroid kanserleri üzerine yapılan araştırmalar hastalığın moleküler bileşenleri üzerine yoğunlaşmaktadır. Daha iyi prognostik faktörler ve daha doğru tanı yöntemleri bulmayı hedefleyen araştırmacılar; tiroid kanserlerinin genetik mutasyonlarını ve gen haritasındaki modifikasyonları ile olan ilişkisini araştırmayı hedeflemişlerdir. Her ne kadar medüller tiroid kanseri ile –ret protoonkogenler arasındaki ilişki kadar net bir ilişki, henüz her hangi bir gen ile iyi diferansiye tiroid kanserleri arasında kurulamamış olsa da ilerleyen araştırmalar umut verici bilgilere ulaşmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen birçok bulgu, iyi diferansiye tiroid kanserlerinde bazı genlerin ekspirasyonun kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında belirgin farklılıklar taşıdığını göstermiştir. Özellikle mRNA düzeyinin sodyum- İyot Transport (NIS) geninde, tirotropin reseptör geninde (TSHr) ve tiroid peroksidaz geninde azaldığı saptanmıştır. Ayrıca tiroidektomi materyallerinde yapılan patoloji çalışmalarında NIS, TSHr ve EKAD genlerinin promotör bölgelerinin diferansiye tiroid kanserlerinde metile formda bulunduğu saptanmıştır (41).



Şekil 3. Tirotropin hormon reseptörü (TSHr) (43).

Tirotropin hormon reseptörü (TSHr) tiroid epitel hücrelerinin plazma membranında sentezlenir. Tiroid bezinin büyümesinde ve diğer fonksiyonlarını gerçekleştirmesinde önemli rollere sahiptir. Gen yapısı 1989 yılında açığa çıkarılan TSHr; 764 aminoasitlik, 10 egzonlu, 7 alt üniteye sahip bir proteindir. Tiroid epitel hücrelerinde sentezlendikten sonra iki majör post- transkripsiyonel modifikasyona uğrar.

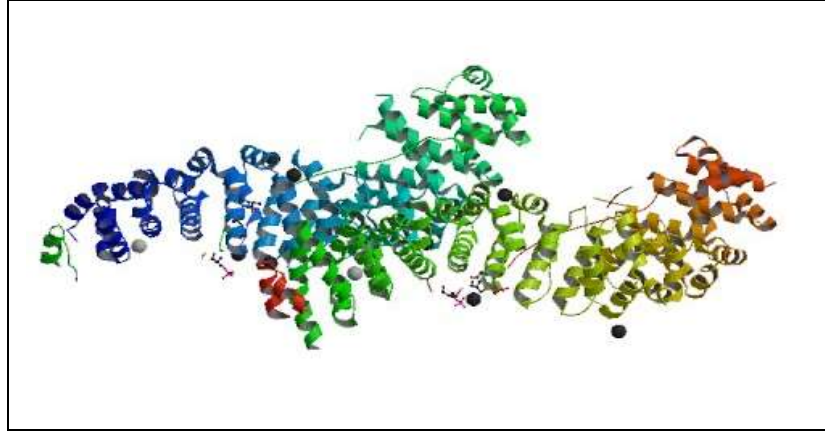
Bunlardan birincisi alfa (α) ve beta (β) alt ünitelerinin birbirine kovalan bağlar ile bağlanması; ikincisi ise dimerik/ multimerik formlara dönüştürülmesidir (42). TSHr'ünün moleküler yapısı şekil 3'de gösterilmiştir.

Trotiropin hormon reseptörü, tiroid epitel hücrelerinde sentezlendikten sonra yine bu hücrelerin sitoplazmik membranlarına bağlanarak burada işlevsellik kazanır. TSHr'ünün aktive olması birçok hücre içi sinyal ileti yolağını aktive eder ve bunun sonucunda tiroid hormon sentezi ve salınımı, tiroid epitel hücrelerinin çoğalması ve hücre bölünmesi gibi pek çok hayati fonksiyona yön verir (42).

Bir tümör süpresör gen olan EKAD, CAM 120/80 veya uvomorulin olarak da bilinir. Kaderin ailesinin klasik bir üyesi olan EKAD, TSHr gibi tiroid epitelyum hücrelerinde 5 ekstraselüler subünit, bir adet transmembranöz segment ve bir adet sitoplazmik kuyruk olmak üzere toplamda 7 alt üniteden oluşur (43). EKAD geninin moleküler yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir.

E- Kaderin geninin fonksiyon veya sentezinde oluşabilecek patolojik değişiklikler, birçok kanser onkogenizinde olduğu gibi iyi diferansiye tiroid kanserlerinde de önemli role sahiptirler. EKAD geninin yoksunluğu, hücreler arası adeziv bağların kaybına yol açar. Bu adeziv bağların kaybı sonrası normal hücrelerin olduğu gibi kanser hücreleri de artmış motilite kazanırlar. Bu artmış motilite sayesinde kanser hücreleri bazal membranı geçebilir ve çevre dokulara invazyon yeteneklerini arttırabilirler (43).

E- Kaderin geninin promotör bölgesi küçük hücreli akciğer kanserinde, diffüz tip mide kanserinde, meme kanserinin invaziv duktal tipinde ve daha birçok invaziv kanser tipinde metile formda bulunmuştur. Dolayısıyla EKAD geninin promotör bölge metilasyonu, prognostik olarak kötü diferansiyasyon göstergesi olarak kabul edilebilir (44).



Şekil 4. E- Kaderin geninin moleküler yapısı (43)

3. MATERYAL- METOD

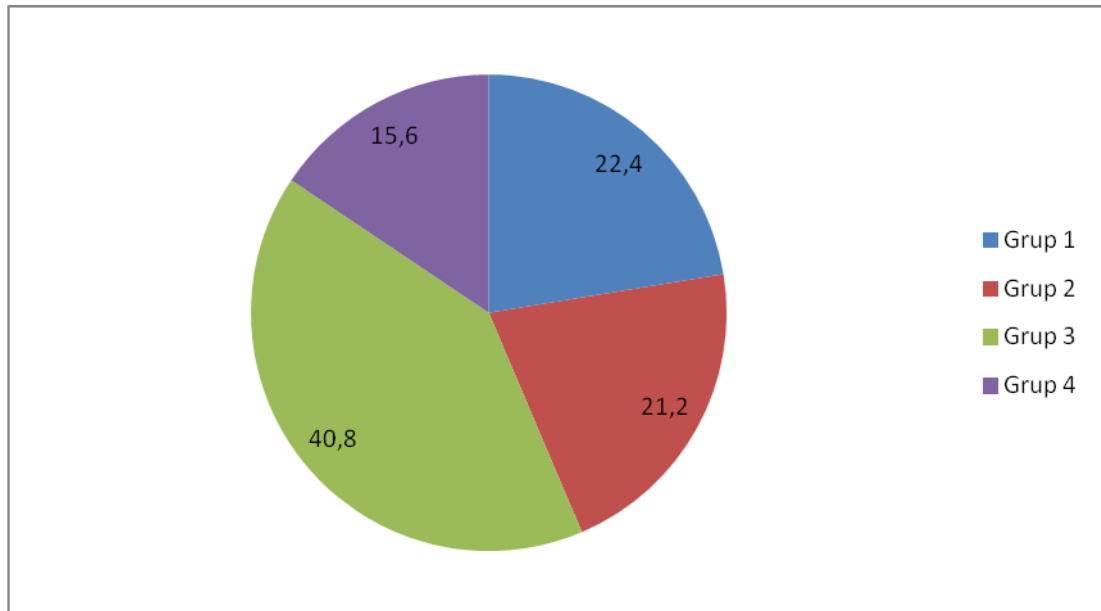
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne 2007- 2011 yılları arasında başvuran, nodüler guatr tanısı bulunan 4355 hastanın dosyaları retrospektif olarak incelenmiştir. İnceleme esnasında ince iğne aspirasyon biyopsisi, yapılan biyopsinin sitolojik değerlendirmesi, tiroid bezi ultrasonografisi, tiroglobulin düzeyi ve diğer tanı yöntemleri sonucunda ameliyat endikasyonu konulan ve hastanemiz Genel Gerrahi Anabilim dalında ameliyat edilen ve tiroidektomi materyali yine hastanemiz Patoloji bölümünce değerlendirilen hastalar içerisinde 95 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar seçilirken ilgili tüm tetkikler ve total tiroidektomi ameliyatının Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yapılmış olmasına, aspirasyon yapılan nodülden karsinom saptanmış olmasına ve nodül boyutunun 1 cm'den büyük olmasına dikkat edilmiştir. Seçilen bu hastaların sitoloji preparatları randomize kontrollü bir çalışma oluşturacak şekilde arşiv materyalden temin edilmiş, arşiv materyalinde tek preparatı bulunan 19 hasta patoloji arşivini bozmamak ve hasta verilerine zarar vermemek adına çalışmadan çıkarılmıştır. Hastaların sitoloji preparatları uzman patolog yardımı ile tekrar değerlendirilmiş ve 149 preparat çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çalışmada 64'ü kadın 12'si erkek olmak üzere toplam 76 hastaya ait veriler analiz edildi. Çalışma hastaları 4 grupta sınıflandırıldı. Grup 1'e İİAB sonucu sitolojik olarak benign saptanan fakat nodül büyüklüğü 3 cm'den büyük olduğu için ameliyat edilen ve ameliyat sonrası patoloji sonucu da benign olarak saptanan hastalar alındı. İİAB sonucu malignite tanısı konulan ve ameliyat sonrası histopatolojik incelemede de malign olarak saptanan hastalar Grup 2 olarak isimlendirildi. Grup 3 ise İİAB sonucu Bethesda sınıflandırma sistemine göre önemi belirsiz atipiyeye (öba) sahip olan hastalardan oluşturuldu. Grup 3 kendi içinde iki alt gruba ayrıldı. Ameliyat sonrası patolojik olarak benign olan gruba Grup 3a ve ameliyat sonrası patolojik olarak

malign olan gruba ise Grup3b ismi verildi. Sitolojik incelemede foliküler neoplazi şüphesi (FNŞ) konulan 12 hasta ise Grup 4'ü oluşturdu. Bu grup da ameliyat sonrası patolojilerine göre iki alt gruba ayrıldı. foliküler adenom tanısı alan hasta grubuna Grup 4a ismi verilirken foliküler karsinom tanısı alan hasta grubuna Grup 4b ismi konuldu. Tablo 13'de hasta grupları ve gruplardaki hasta sayıları şematize edilmiştir. Hasta gruplarının yüzde olarak dağılımı grafik 1'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Çalışmadaki hasta grupları ve gruplardaki hasta sayıları.

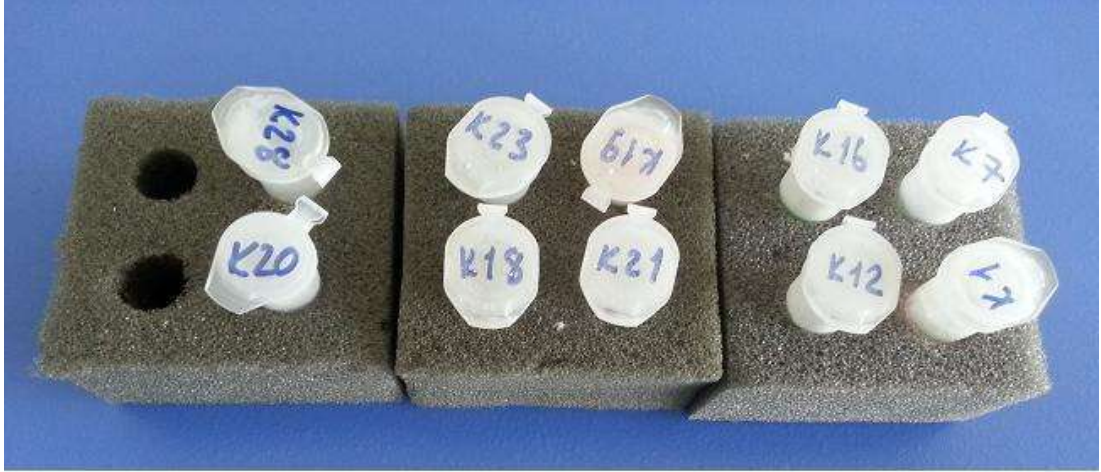
Hasta Grup Adı	İİAB sonrası tanı	Ameliyat Sonrası tanı	Hasta sayısı
Grup 1	Benign	Benign	17
Grup 2	Malign	Malign	16
Grup 3			31
Grup 3a	Önemi belirsiz atipi	Benign	14
Grup 3b	Önemi belirsiz atipi	Malign	17
Grup 4			12
Grup 4a	Foliküler neoplazi şüphesi	Foliküler adenom	6
Grup 4b	Foliküler neoplazi şüphesi	Foliküler karsinom	6



Grafik 1. Hasta gruplarının yüzde olarak grafiksel dağılımı

3.1. DNA İZOLASYONU

Seçilen Hematoksin- Eozin ile boyanmış preparatlar ksilen ile dolu kaplar içerisine konularak 24- 36 saat boyunca 37 °C ısıdaki etüvde bekletildikten sonra lam ve lameller birbirlerinden ayrıştırıldı. Ayrıştırılan lamalar bistürü yardımı ile kazınıp tüplere alındıktan sonra uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) 500 µl lysis buffer eklendi. Uygun pipet ve pipet ucuyla (2- 20 µl) 20 µl proteinaz K eklendi. Elde edilen çözelti 55°C 'deki su banyosunda 12 saat erimeye bırakıldı. On iki saatlik bekleme sonrasında eriyen çözelitiye uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) 500 µl fenol, 300 µl kloroform eklendikten sonra rotatorla 10 dk. karıştırıldı. Elde edilen tüpler Kubota 3300 marka santrifüje yerleştirildikten sonra oda ısısında (20- 25°C) 15.000 rpm. de 2 dk. santrifüj edildi. Uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) pipet ucu orta ve alt tabakaya değdirilmeden supernatan çekildi ve 1.5 ml hacimli kapaklı yeni tüplere alındı. Uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) 1:1 hacminde kloroform tüplere eklendi. Elde edilen çözelti rotatorda 10 dk. süre boyunca karıştırıldı. Elde edilen çözelti Kubota 3300 marka santrifüje yerleştirildikten sonra oda ısısında (20- 25°C) 15.000 rpm.'de 2 dk. boyunca santrifüj edildi. Uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) pipet ucu orta ve alt tabakaya değdirilmeden supernatan çekilerek 1.5 ml hacmindeki tüplere alındı. Uygun pipet ve pipet ucuyla (100- 1000 µl) çözeltinin 2.5 katı kadar soğuk alkol (%99.99 ethanol) eklendi. Sonrasında tüpler -80° C' de 2 saat bekletildi. -80° C'den çıkartılan tüpler öncesinde +4 °C'ye getirilmiş soğutmalı santifüje yerleştirildikten sonra 3.000 rpm.'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin içerisindeki sıvı boşaltıldıktan sonra pelet 15 dk. kurumaya bırakıldı. 37°C'deki su banyosunda 2 saat bekletildikten sonra bisülfid modifikasyonuna geçildi. Resim 1'de DNA izolasyonu sırasında santrifüjde kullanılan tüpler görülmektedir.



Resim 1. Çalışma sırasında kullanılan santrifuj tüpleri

3.2. Bİ-SÜLFİT MODİFİKASYONU

DNA modifikasyonu için Hacettepe Bilimsel Araştırma ve Projelendirme kurulunca düzenlenen ihaleyi kazanan firma tarafından temin edilen Chemicon International Company'e ait CpGenoma DNA Modification Kit S7820 kullanılmıştır. Kit içerisinde dört adet modifikasyon işlemi sırasında kullanılması gereken ayaç mevcuttur. Bu ayaçlar bi- sülfıt modifikasyonu esnasında kit kullanım kılavuzunun uygun gördüğü şekil ve sırada kullanılmıştır.

Modifikasyon prosedüründe kullanılmak üzere her test grubu için taze hazırlanıp kullanılan çeşitli kimyasal çözeltiler hazırlanmıştır. 1 gr. Sodyum- Hidroksit (NaOH) tableti 8.3 ml suyun içinde çözülerek 3 M NaOH stoğu elde edilmiştir. Yine modifikasyon sürecinde kullanılmak üzere %100'lük etanolden 900 µL, 93.4 µL H₂O ve 6.6 µL 3 M NaOH karıştırılarak 20mM NaOH/ %90 etanollük ikinci bir çözelti elde edilmiştir.

0.227 gr DNA modifikasyon ayağı 1 ve 0.571 mL su vortekslenmek suretiyle karıştırılmıştır. Önceden hazırlanmış olan 3 M NaOH'den örnek başına yaklaşık 20 µl alınarak solüsyonun pH'sı 5.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen solüsyonun güneş ışınlarından korunmasına özen gösterilmiş ve elde edildikten hemen sonra taze olarak kullanılmıştır.

DNA modifikasyon ayracı 2; 1 μL β - merkaptoetanol, 20 mL deiyonize su ile karıştırılmıştır. Oluşturulan solüsyondan 750 μL alınarak modifiye edilecek tüm örneklere 1.35 gr DNA modifikasyon ayracı 2 katılmıştır.

Ayraçlar sulandırılıp hazırlandıktan sonra, modifikasyon prosedürüne geçilmiştir. 7.0 μL 3M NaOH, 1.0 μg DNA ile 100 μL su içerisinde karıştırılmıştır. Karışım 50°C de 10 dk. süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben 550 μL taze hazırlanmış DNA Modifikasyon Ayracı 1 karışıma eklenmiş ve vortekslenmiştir. Yeni karışım 50 °C’de 20 saat boyunca güneş ışığından sakınarak inkübe edilmiştir.

DNA modifikasyon ayracı 3 sıvı hale gelene dek vortekslenmiştir. Sıvı hale gelen solüsyondan 5 μL DNA karışımının bulunduğu tüplere alınmıştır. Aynı tüplere DNA Modifikasyon ayracı 2’den 750 μL ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. 5000 rpm. de 10 sn. santrifüje tabii tutulan karışımın süpernatant kısmı atılmıştır. Kalan kısma 1.0 ml %70’lik etanol eklendikten sonra 5000 rpm’de 10 sn. santrifüj edilmiştir. Bu işlem üç kez üst üste tekrarlanmış ve her defasında süpernatant kısım atılmıştır.

Üç kez tekrar edilen işlemin ardından tüpte kalan palet 50 μL 20mM NaOH/ %90 etanol uygun pipetler yardımıyla eklenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra 5000 rpm. hızla 10 sn. süresince santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrasında 1.0 ml %90’lık etanol eklenmiştir. Son olarak süpernatant kısım tekrar atılmış ve tüpler oda sıcaklığında 10- 20 dk. süre boyunca kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemler birlikte bisülfit modifikasyonu tamamlanarak, metisilin spesifik polimeraz zincir tepkimesi aşamasına geçilmiştir.

3.3. METİLASYON SPESİFİK POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ (M-PCR)

TSHr ve EKAD genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primer baz dizileri tablo 12’de gösterilmiştir.

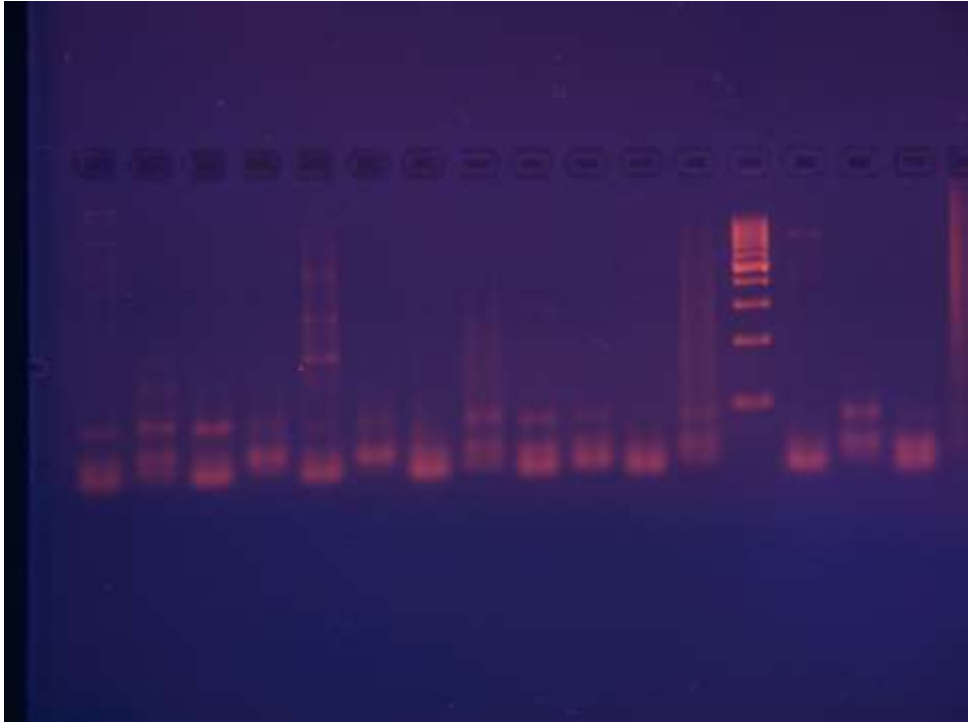
Tablo 13. TSHr ve EKAD gen amplifikasyonlarında kullanılan pirimer baz dizileri

İsim	5' – 3'
TSHr anmetile sens	TGTAGAGTTGAGAATGAGGTGATTTT
TSHr anmetile anti- sens	CACCAACRAACAACAAARCCACCA
TSHr metile sens	TGTAGAGTTGAGAATGAGGTGATTTC
TSHr metile anti- sens	CCACTACAACAARCCGCCG
EKAD anmetile sens	TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT
EKAD anmetile anti- sens	CACAACCAATCAACAACACA
EKAD metile sens	TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT
EKAD metile anti- sens	TAACTAAAAATTCACCTACCGAC

Metilasyon spesifik PCR koşullarını gerçekleştirmek için %3'lük DMSO, 16.6 mM amonyum sülfat, 67mM Tris-Borate-EDTA buffer (Santa Cruz Comp.), (pH 8.8), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM 2- merkaptoetanol, 1.23 mM deoksinukleotittrifosfat, sens ve anti- sens DNA primerlerinin her birinden 2.25 ng, 1 µl bi-sülfid modifikasyonu yapılmış DNA ve 0.5 ünite DNA Taq polimeraz (Invitrogen Comp.) bir araya getirilmiştir.

TSHr ve EKAD genlerinin Metisilin spesifik PCR'ı için yürütülen işlem, uygun devir, zaman ve sıcaklıklar ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Bir döngü 95°C de 15 dk, 95°C de 45 sn, 61°C de 45sn ve 72°C de 1 dk'dan ibarettir. Bu döngü 40 kez tekrarlanmıştır. Son olarak 72°C 'de 10 dk 1 tur beklenmiştir. Elde edilen PCR ürünü +4°C'de bekletilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri %3'lük agoroz jel elektroforezde 1 saat yürütüldükten sonra işlem sonuçlandırılmıştır. Jel görüntülemeleri Major Science DI-01 model cihaz yardımıyla yapılmıştır. TSHr anmetile için 91 bp, TSHr metile için 88 bp band değerleri referans alınmıştır. EKAD anmetile için 100bp, EKAD metile için 111 bp band değerleri referans olarak alınmıştır. Resim 2'de TSHr'üne ait jel elektroforez görüntüsü gösterilmiştir.



Resim 2. TSHr jel elektroforez görüntüsü

M- PCR için MyGene Series Peltier Thermal Cyclers Model MG96+ kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Hastalara ait veriler SPSS 21.0 veritabanı kullanılarak analiz edilmiştir. Hastalara ait demografik verilerin sıklık tabloları yapılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki ki-kare testi ile analiz edilmiştir. Sayısal veriler normal dağılım varsayımlarını karşılamadığı için iki bağımsız grup arasındaki sayısal veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İki'den fazla gruplarda sayısal veriler Kruskal Wallis testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel çıkarımlar iki yönlüdür. P değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

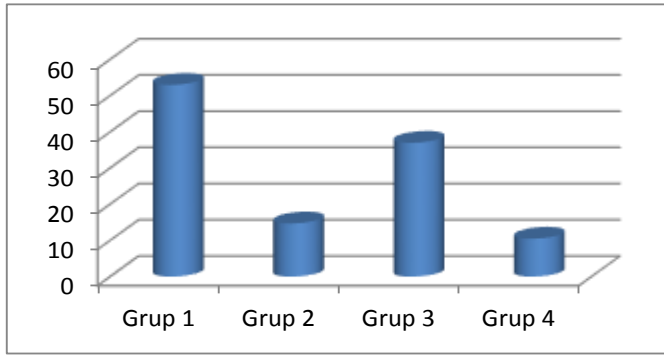
Analiz edilen hastaların 64'ü kadın (%84,2) 12'si ise erkekti (%15,8). Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşı 50 olarak saptandı (26- 80). Kadın ve erkek hastaların buldukları hasta grubu ile yaşları arasında herhangi bir istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktaydı ($p = 0,864$).

Çalışmaya dahil edilen hastaların 31'inde (%40,8) TSHr'ü metile olmayan formda saptanırken, 45 hastada (%59,2) TSHr'ü metile formda bulundu. Her iki cinsiyette TSHr metilasyon sıklığı benzerdi (kadınlarda %62,5, erkeklerde %41,7; $p=0,178$). Bu bulgudan yola çıkarak kadın veya erkek cinsiyet ile TSHr metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı saptandı.

TSHr metilasyonu ve hastaların yaşı ile ilgili bilgiler analiz edildiğinde, 40 yaşın üstü ve 40 yaşın altı olan hastalarda TSHr metilasyon oranları benzer olarak bulundu (sırasıyla %57,1; 63,0). Bu analiz sonucunda TSHr metilasyon durumu ile hasta yaşı arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı saptandı ($p=0,621$).

Bakılan biyokimyasal parametrelerden tiroglobulin değeri yüksek olarak ölçülen (>50 ng/ml) hastalarda TSHr metilasyon oranı, normal değerde ölçülen hastalara oranlandığında istatistiksel olarak anlamlı farkın bulunmadığı saptandı. (%53,6, %65,1; $p=0,331$). TSHr metile olarak saptanan hastalarda ortalama tiroglobulin düzeyi 20.0 ng/ml iken TSHr metile olmayan hasta grubunda ortalama tiroglobulin düzeyi 41.8 ng/ml idi. Metile olmayan grupta tiroglobulin düzeyi, metile gruptaki

hastalardan yaklaşık olarak 2 kat daha yüksek ölçülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p= 0,062$). Hasta gruplarına göre tiroglobulin düzeyi incelendiğinde malign hastalarda (grup 2) ortalama tiroglobulin düzeyi 14,7 ng/ml olarak hesaplanırken benign olan hasta grubunda (grup 1) bu oran 53 ng/ml olarak hesaplandı. Önemi belirsiz atipili hastaların olduğu grupta tiroglobulin düzeyi 37 ng/ml iken foliküler neoplazi şüphesi olan grupta bu oran 10,5 ng/ml dı. Gruplar arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmamaktaydı ($p=0,236$) Elde edilen bulgular Grafik 2’de gösterilmiştir.

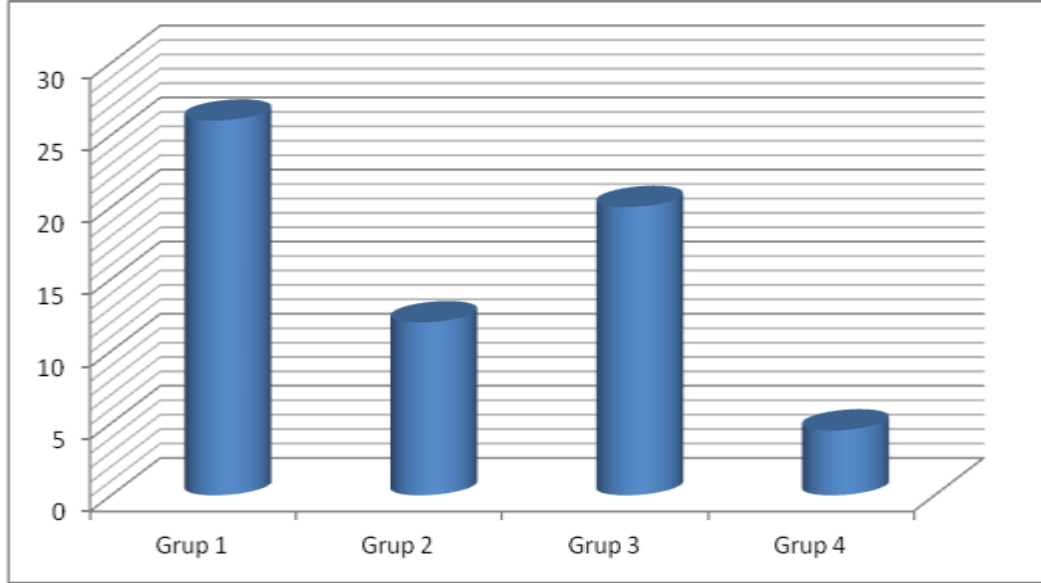


Grafik 2. Hasta gruplarına göre ölçülen ortalama tiroglobulin değerleri. (ng/ dl cinsinden)

Ultrasonografik olarak yapılan ölçümler sonrasında tiroid nodül boyutu ile hasta grupları karşılaştırıldığında, sitolojik ve histopatolojik olarak malign olan grupta (grup 2) ortalama nodül boyutu 12 mm olarak saptandı. Sitolojik ve histopatolojik olarak benign tanıya sahip grupta (grup 1) ise ortalama nodül boyutu 26 mm idi. Önemi belirsiz atipi grubundaki (grup 3) ortalama nodül boyutu 20 mm İken foliküler neoplazi şüphesi bulunan grupta (grup 4) bu değer 28 mm olarak saptandı. Bu değerler istatistiksel olarak analiz edildiğinde nodül boyutu ile malignite arasında anlamlı bir ters orantı varlığı saptandı ($P= 0,002$).

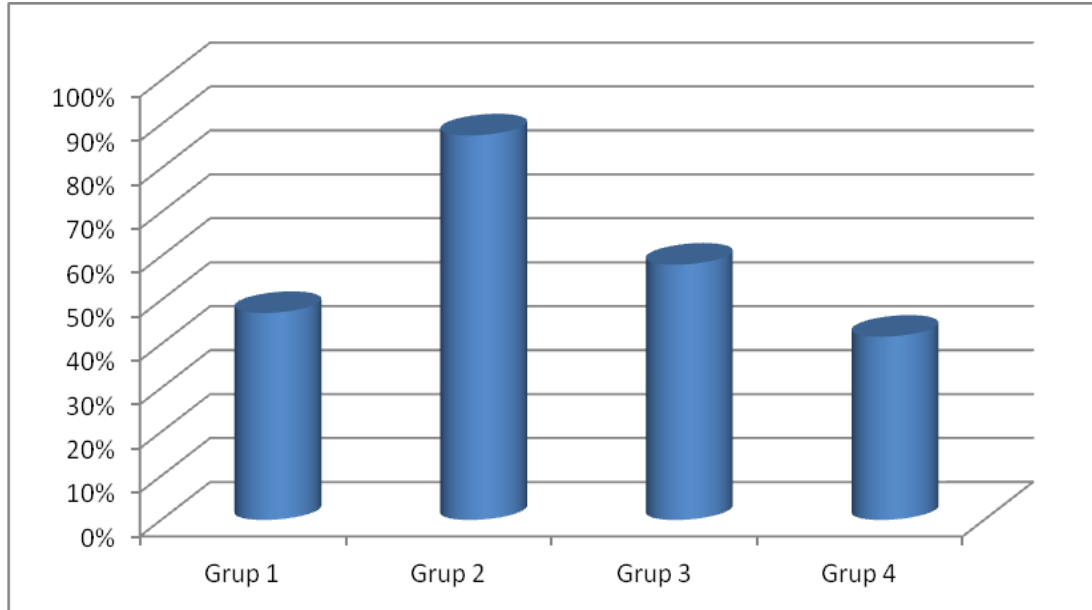
Ultrasonografik olarak elde edilen nodül boyutları ile TSHr’ünün metile olan veya olmayan formları arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı ($p= 0,011$). TSHr’ü

metile olan hastalar incelendiğinde bu hastalardaki ortalama nodül boyutu 20 mm iken TSHR'ü metile olmayan hastalardaki ortalama nodül boyutu 26 mm olarak saptandı. Grafik 3'te çalışmaya dahil edilen hasta gruplarında milimetre cinsinden ortalama nodül boyutları gösterilmiştir.

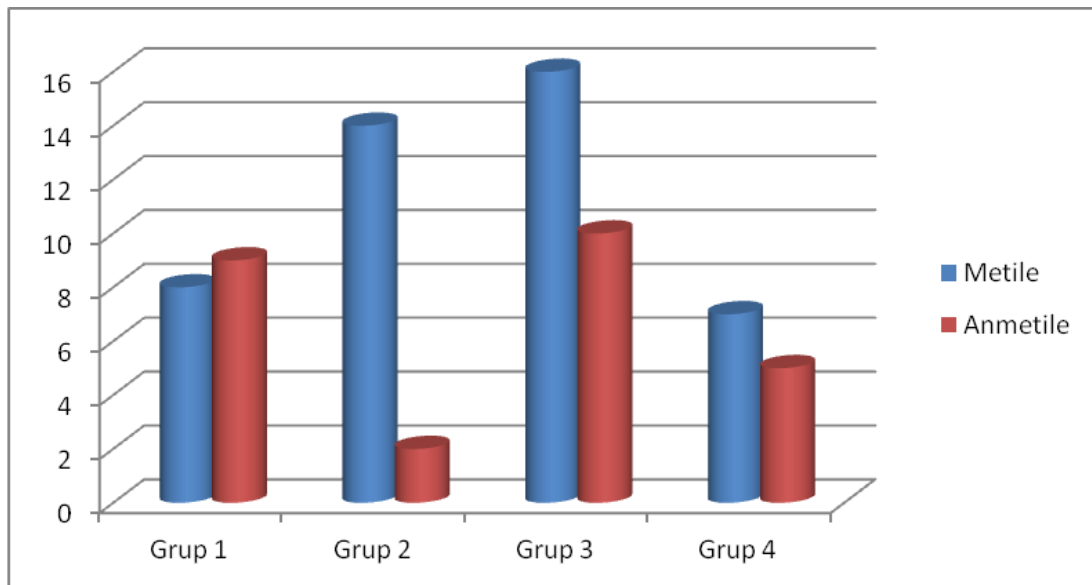


Grafik 3. Hasta gruplarına göre ortalama nodül boyutları (milimetre cinsinden)

Yapılan değerlendirmede, sitolojik inceleme sonuçlarına göre TSHr metilasyon durumu incelendiğinde, en yüksek oranda reseptör metilasyonuna malign olarak rapor edilen hasta grubunda rastlandı (%87,5). Sitolojik olarak benign kriterlere sahip hastalarda ise TSHr metilasyon oranı %47,1 olarak saptandı. Önemi belirsiz atipi (öba) grubunda ise TSHr metilasyon oranı %58,1 iken sitolojik olarak foliküler neoplazi şüphesi bulunan grupta ise metilasyon oranı %41,7'idi. Tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,048$). Bulgular grafik 4 ve 5'te gösterilmiştir.



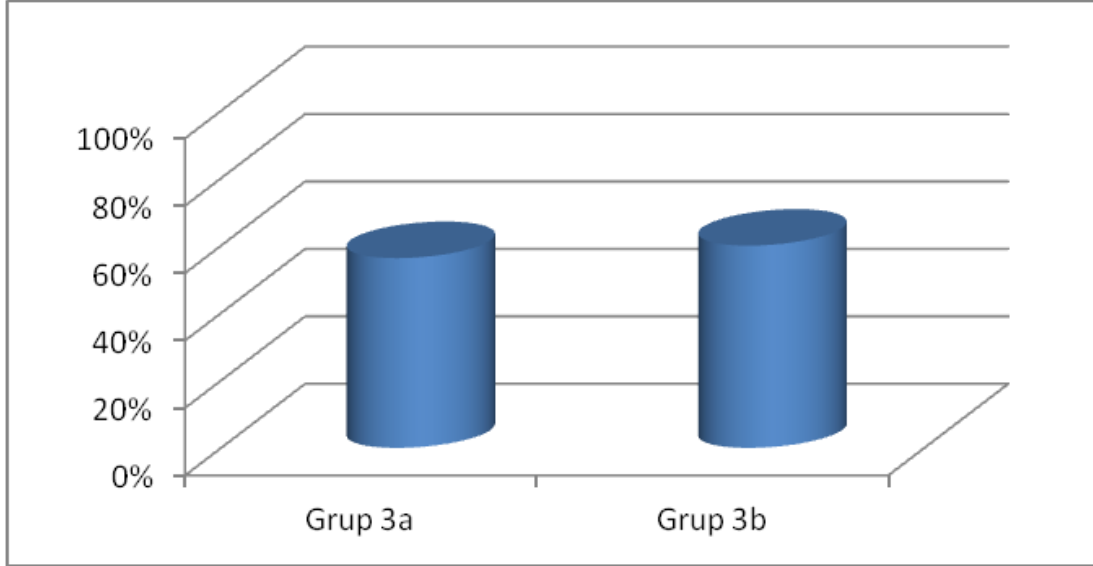
Grafik 4. Sitolojik tanılarına göre hastalardaki TSHr metilasyon varlığı



Grafik 5. TSHr'ünün metile olan ve olmayan formlarındaki hasta sayıları

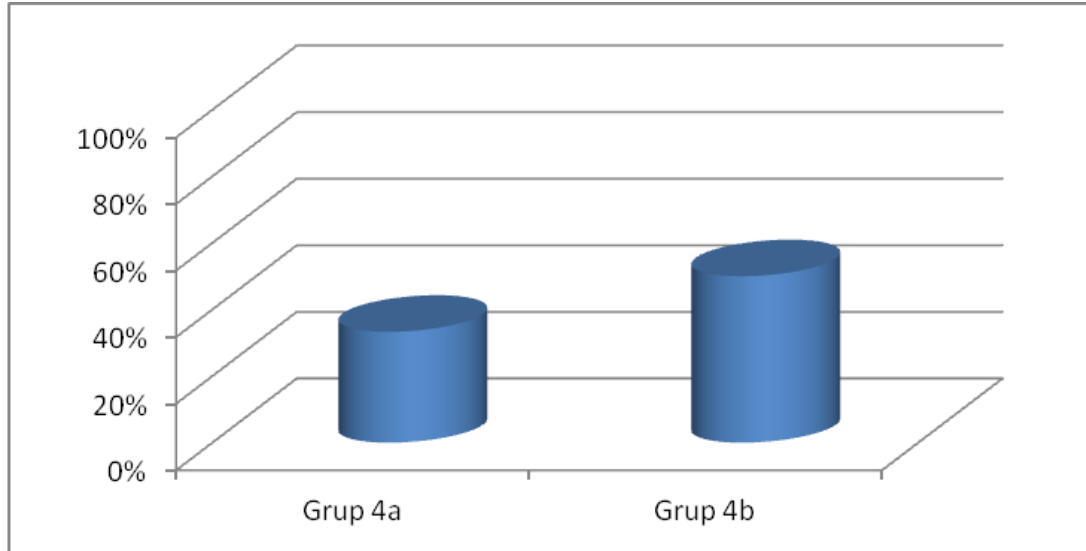
Gruplar arasında yapılan incelemede ameliyat öncesi tetkiklerinde sitolojik olarak önemi belirsiz atipi olarak tanımlanan ancak ameliyat sonrası histopatolojik olarak benign olarak nitelendirilen hastaların (Grup 3a) %56,3'ünde TSHr'ünün metile olduğu tespit edildi. Ameliyat öncesi önemi belirsiz atipi olarak adlandırılan fakat ameliyat sonrası histopatolojik olarak malign olduğu tespit edilen hastalarda (Grup 3b) ise TSHr metilasyon oranı %60 oranında izlendi. Oranlar arasındaki farkın

istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptandı ($p=0,833$). Grafik 6'da bu bulgular gösterilmiştir.



Grafik 6. Grup 3a ve Grup 3b'de ki hastaların TSHr metilasyon durumu.

İnce iğne aspirasyon biyopsisi sonucu yapılan sitolojik incelemede foliküler neoplazi şüphesi konulan hastalardan ameliyat edildikten sonra histopatolojik olarak foliküler adenom tanısı alan hasta grubunun (Grup 4a) %33.3'ünde TSHr metile %66.6'sı metile olmayan formda saptandı. Yine ameliyat öncesi dönemde foliküler neoplazi şüphesi bulunan ve ameliyat sonrasında foliküler karsinom tanısı alan hasta grubunda (Grup 4b) ise TSHr metilasyon oranı %50 olarak saptandı. Oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0,558$). Bu bulgular Grafik 7'de gösterilmiştir.



Grafik 7. Dördüncü Gruptaki hastaların TSHr metilasyon oranları

Çalışmada metilasyon durumu incelenen bir diğer gen ise EKAD geni idi. EKAD değerlendirilirken çalışma grupları TSHr'ünde isimlendirildiği gibi adlandırıldı. Çalışma sonuçlarında Benign grupta 1 hastada EKAD gen metile formda saptanırken 1 hastada metile olmayan formdaydı. Malign hasta grubunda ise sadece 1 hastanın gen reseptörünün metile olmayan formda saptandığı görüldü. Önemi belirsiz atipi grubunda 2 hastada EKAD gen metile formda saptanırken metile olmayan formda hasta saptanmadı. Foliküler neoplazi grubunda bir hastada metile olmayan form saptanırken sitolojik olarak foliküler neoplazis şüphesi konan sonrasında histopatolojik olarak karsinom tanısı alan hasta grubunda ise bir hastada EKAD geni promotör bölgesi metile formda saptandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirmeye uygun olmadığı için gruplar arası metilasyon varlığı istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmadı.

5. TARTIŞMA

İyi diferansiye tiroid kanserleri ve TSHr metilasyonu arasındaki ilişki incelendiğinde, birçok çalışmada kanser varlığı ile reseptörün metile formu arasında anlamlı bir ilişki olduğu bilinmektedir (2, 44, 45,46, 47, 48). Fakat çoğu araştırmada bu ilişki histopatolojik olarak incelenmiş, sitolojik olarak TSHr'ünün iyi diferansiye tiroid kanserlerindeki metilasyon varlığı net olarak aydınlatılamamıştır.

Planladığımız çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde literatürde var olan çalışmalardan en önemli farklılığın çalışmanın sitoloji preparatları kullanılarak gerçekleştirilmiş olmasıdır. Çünkü çalışmamızın amacı gereksiz cerrahi işlemlerin önüne geçmek için ameliyat öncesi tetkikler ile tanı konulamayan hastalarda tiroid kanseri varlığının gösterilip gösterilemeyeceğidir.

Saptanan en önemli sonuçlardan biri sitoloji preparatları kullanılarak, papiller tiroid kanserli vakalarda (17 hasta) %87,5 oranında, foliküler karsinomlu hastalarda (6 hasta) %50 oranında ve anaplastik karsinomlu vakalarda ise %100 (2 hasta) oranında TSHr promotör bölge metilasyonun gösterilmiş olmasıdır. Özellikle papiller karsinomlu hasta grubunda TSHr metilasyon oranının, kontrol grubundaki benign noduler guatrli hastalara göre anlamlı oranda yüksek bulunması ($p < 0.05$) TSHr'ünün bir kanser belirteci olarak kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

Papiller tiroid kanserinin onkogenetik süreci göze alındığında benign noduler guatrli hastalar da TSHr metilasyonu %47,1 oranında iken, önemi belirsiz atipi grubunda bu oran %58,1'e papiller tiroid kanserli grupta ise %87,5'e kadar yükselmiştir. Malignite sürecindeki basamaklar boyunca istatistiksel olarak anlamlı oranda artan TSHr metilasyonu varlığı metilasyonun özellikle papiller tiroid kanserindeki önemini göstermektedir. Bu bulgudan yola çıkarak de- metilizan ajanların ilerleyen teknoloji ve bilgiler ışığında papiller tiroid kanserlerinin tedavisinde kullanılacağı düşünülmüştür. Won Gu Kim ve arkadaşlarının Ulusal Kanser Enstitüsü'nde 2013

yılında aynı noktadan hareket ederek planladıkları çalışmanın sonuçları ilham verici niteliktedir. Bu çalışmada metile formda olduğu için deaktive olan TSHr β alt ünitesi demetilizan bir ajan olan 5'-aza- 2'deoksinukleotit kullanılmak suretiyle reaktive edilmiş ve tiroid kanserinin progresyonu engellenmeye çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda demetilizan ajan kullanılan grupta, onkogenetik diferansiyasyonun %90 oranında azaldığı saptanmıştır (45).

Çalışmaya dahil edilmiş kötü prognostik kriterlere sahip papiller tiroid kanserli hastaların (9 hasta) TSHr promotör bölge metilasyon varlığı incelendiğinde tüm hastaların metile formda olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu bulgudan yola çıkarak, ilerleyen dönemde yapılan çalışmalarla TSHr metilasyonun bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği gibi prognostik bir faktör olarak da değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

Mevcut yöntemlerle tıbbi tedavisinin tartışmalı olduğu hasta gruplarından biri Bethesda sınıflandırma sistemindeki önemi belirsiz atipi grubudur. Günümüz bilgileri ışığında önemi belirsiz atipili olgularda Bethesda sisteminin öngördüğü malignite oranı %15 iken bizim çalışmamızı planlarken incelediğimiz 4355 hasta dosyasından çıkardığımız sonuçlarda bu oranın %35'lere kadar çıktığıdır. Ülkenin farklı üniversite hastanelerinde farklı uzman sitologlarca değerlendirilen önemi belirsiz atipi olgularında da benzer oranlar elde edilmiş özellikle papiller tiroid kanserli olgularda artış olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiye dayanarak Bethesda sınıflandırma sisteminde papiller tiroid kanseri şüphesi adı altında yeni bir grup güncellemesine gidilebileceği düşünülmüştür. Böyle bir grup varlığında önemi belirsiz atipi adı altındaki vakaların bir kısmının bu yeni gruba dahil olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda sitolojik olarak önemi belirsiz atipi grubunda olan ancak ameliyat sonrası histopatolojik olarak benign olarak nitelendirilen hastaların %56,3'ünde TSHR'ünün metile olduğu tespit edildi. Ameliyat öncesi önemi belirsiz atipi olarak adlandırılan fakat ameliyat sonrası histopatolojik olarak malign olduğu tespit edilen hastalarda ise TSHr metilasyon oranı %60 oranında izlendi. Oranlar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı saptandı ($p=0,833$). İstatistiksel olarak bu

anlamsızlığa yol açan temel faktörün ise benign olduğu bilinen dokularda da TSHr metilasyonunun görülebilmesinin yol açtığı düşünüldü.

Günümüz tanı yöntemleri ile ameliyat öncesi dönemde foliküler karsinom ve foliküler adenom ayrımı net olarak yapılamamaktadır. Bu ayrımda TSHr metilasyon durumunun ameliyat öncesi bir tetkik olarak kullanılabilirliği, çalışmamızdaki ilgili grubun hasta sayısı yeterli olmadığı için sınırlıdır. Mevcut hasta sayılarıyla, sitolojik olarak foliküler neoplazi şüphesi konulduktan sonra ameliyat edilen fakat histopatolojik olarak foliküler adenom tanısı alan grupta metilasyon oranı %33 iken bu hasta grubunda metile formda olmayan TSHr yüzdesi %66 olarak saptanmış, arada matematiksel olarak iki kat kadar anlamlı bir fark olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı farklılığın bulunmaması hasta sayısının kısıtlı olmasına bağlanmıştır. Daha uzun dönemi kapsayan ve daha fazla sayıda foliküler karsinom ve foliküler adenom hastası içeren bir çalışmanın planlanıp gerçekleştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmüştür.

İnce iğne aspirasyon biyopsisinin genel olarak tanı koyduruculuk oranı %90 düzeyinde iken nodül boyutu arttıkça yanlış negatif sonuç oranının arttığı düşünülmektedir. Bu nedenle merkezimizde de 30 mm'den büyük nodüllere tiroidektomi ameliyatı önerilmektedir. Çalışmamızda saptanan anlamlı bulgulardan bir tanesi de ultrasonografik olarak ölçülen tümör çapı ile malignite arasındaki ilişkidir. İncelediğimiz malign olgularda tiroid nodul boyutu 12 mm iken, benign hastaların olduğu grupta ortanca tiroid nodul boyutu 26 mm olarak saptanmıştır. Bu neticeye tiroidektomi planı yapılırken nodül büyüklüğünün ön planda tutuluyor olmasının yol açtığı düşünülebilir. Shrestha ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınladıkları ve tiroid nodülünün çapı ile tiroid kanseri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmanın sonuçları da benzer niteliktedir. Bu çalışmada 2001 ve 2011 yılları arasında Bethesda'da bulunan merkezlerine başvuran ve ince iğne biyopsisi yapılan 3013 hastanın sonuçları incelenmiştir. Bu bulgularda nodül çapının 40 mm'den büyük olmasının tiroid kanseri riskini arttırmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada bilinenin aksine ince iğne biyopsisinin yanlış negatiflik oranının büyük nodüllerde artmadığı gibi 10 mm'nin altında bu oranda bir artış olduğu saptanmıştır (46).

Araştırmamızda bakılan bir diğer parametre ise tiroglobulin düzeyidir. Yapılan istatistiksel çalışmalar sonrasında elde edilen verile göre çalışma grupları arasında ve TSHr metilasyonu bulunan olgular ile bulunmayan olgular arasında tiroglobulin düzeyi açısından anlamlı bir istatistiksel ilişki bulunmamaktadır.

Tiroid kanserlerinde TSHr promotör bölge metilasyonunu araştıran bir diğer çalışma Smith J.A ve arkadaşlarının (47) 2011 yılında yayınladıkları 59 hastalık çalışmadır . Bu araştırmada TSHr, EKAD, NIS-L, ATM ve DAPK proteinlerinin promotör bölge metilasyonu taze doku örnekleri alınmak suretiyle incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarında da özellikle TSHR promotör bölge metilasyonun malign dokularda kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir (p=0.03). Smith J.A ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kontrol grubunda bulunan 2 hastada metilasyon saptanırken diğer 25 hastada TSHr metilasyonu bulunmamaktadır (%7.40). Malign olan grupta ise 32 hastanın 11'inde metilasyon saptanmıştır (%34). Bizim çalışmamızda elde edilen oranlara baktığımızda, malign olan olguların, sitolojik inceleme sonrası bakılan TSHR metilasyon oranı %87.5 iken benign olan olguların TSHr metilasyon oranı %47.1 olarak saptandı. Yine aynı çalışmada değerlendirilen, hastaların yaşı ile reseptör metilasyonu arasında, çalışmamızda olduğu gibi anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (47).

Xing M. (48) ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada TSHR'ünün epitelyal tiroid kanserlerindeki metilasyon durumu yine taze doku örnekleri incelenmek suretiyle araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda benign nitelikte nodüle sahip 8 hastanın hiç birinde TSHR metilasyonu saptanmaz iken, Foliküler karsinomlu 15 hastanın 7'sinde (%47.5), Papiller tiroid kanserli 39 hastanın 23'ünde (%59) ve anaplastik kanserli 11 hastanın 2'sinde (%18) TSHr metilasyonu saptanmıştır. Bizim çalışmamızla karşılaştırmak gerekirse Foliküler karsinomlu hastalarda benzer oranda metilasyon saptanırken (%50), Anaplastik karsinomlu hastalarda metilasyon oranı bizim çalışmamızda %100 olarak saptanmıştır. Burdaki belirgin farklılığın sebebi bizim çalışmamızda Anaplastik karsinomlu hasta sayısının 2 olması olabilir. Papiller tiroid kanserli hastaların TSHr metilasyon oranı ise çalışmamızda %87.5 olarak saptanmıştır. Bu oranlar arasındaki farklılık ise bizim çalışmamızdaki hasta sayısının daha fazla olmasından kaynaklanmış olabileceğini

düşünmekteyiz. Oranlar arasındaki minimal farklılıkların bir diğer sebebi de Xing ve arkadaşlarının çalışmalarında taze dokudan mikrodiseksiyon yolu ile direkt olarak tümörlü alandan elde ettikleri dokularla çalışmış, bizim çalışmamız da ise İİAB ile elde edilen sitolojik örnekler kullanılarak çalışma yürütülmüştür. Metodlar arasındaki bu farklılığın da sonuçlara yansıdığı kanısındayız (48).

Dai YL (49) ve arkadaşlarının 2010 yılında 82 hasta ile yaptığı araştırmada papiller tiroid kanserli hastalarda TSHr promotör bölge metilasyonu araştırılmıştır. Yine bu çalışma da diğer çalışmalar gibi tümör dokularından DNA elde edilmesini takiben gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada papiller tiroid kanserli hastalarda metilasyon oranı %68 iken kontrol grubunda bu oran %21.9 olarak saptanmıştır. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık kaydedilmiştir ($p < 0.05$). Bizim çalışmamızda da Dai YL ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi tiroid kanserli hastalar ile kontrol grubu hastaları arasında anlamlı oranda metilasyon varlığı saptanmıştır. Fakat hem kanserli hasta sayımızın daha fazla olması hem de çalışmamızın sadece papiller tiroid kanserli hastalarla sınırlı olmaması; aynı zamanda foliküler ve anaplastik karsinomlu hastalarda da TSHr metilasyonunun değerlendirilmiş olması bahsedilen çalışmaya oranla yaptığımız çalışmanın üstünlükleri olarak değerlendirilebilir (49).

Çalışmamızda metilasyon varlığı araştırılan bir diğer gen olan EKAD geni ile ilgili sağlıklı sonuç alınamamıştır. İlgili genin yapılan deneylerde temin edilen kit kontrol DNA'larında metilasyon saptanırken elde ettiğimiz hastaların DNA'larında yeterli miktar ve uygun band aralığında metilasyon gerçekleştirilememiştir. Buna yol açan temel sorunun teknik ve teknolojik yetersizlik olduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Tiroid kanseri tanısında ve mevcut tanı yöntemleriyle benign- malign ayrımının yapılmasının güç olduğu nodüler guatr tanısı almış olan hastalarda TSHr ve EKAD gen metilasyonlarının klinik kullanımının araştırıldığı çalışmamızın sonuçlarına göre:

- 1- Tiroid papiller kanserli hastalarda TSHr metilasyon oranının bir tümör belirteci olarak kullanılabilir özelliklere sahip olabileceğini düşündüren bulgular saptanmış, farklı hasta grupları ve daha fazla sayıda hasta ile yapılacak olan çalışmalar doğrultusunda daha net veriler elde edileceği düşünülmüştür.
- 2- Kötü prognozlu papiller tiroid kanserli hastaların hepsinde TSHr'nün metile formda olduğu gözlenmiştir.
- 3- Önemi belirsiz atipiye sahip olgularda TSHr metilasyon oranının, malignite potansiyelini belirlemede istatistiksel olarak anlamlı bir rolünün olmadığı görülmüştür.
- 4- Foliküler neoplazi şüphesi bulunan olgularda TSHr metilasyon oranının, malignite potansiyelini belirlemede istatistiksel olarak anlamsız olmasına karşın, bu istatistiksel anlamsızlığın hasta sayısı yetersizliğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüş ve hasta sayısı artırılarak tekrar değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır.
- 5- Cinsiyet, yaş, nodül boyutu ve kan tiroglobulin düzeyi ile TSHr metilasyonu arasında anlamlı istatistiksel ilişki bulunmamıştır.
- 6- Teknik ve teknolojik yetersizlik nedeniyle EKAD gen metilasyonu hakkında sağlıklı sonuç elde edilememiştir.

Bu çalışmanın sonucunda, TSHr metilasyonunun tiroid kanser genetiğindeki önemi bir kez daha anlaşılmıştır. Hasta sayıları arttırılmak sureti ile yapılacak yeni çalışmaların TSHr metilasyonunun prognostik bir faktör olarak değerlendirilmesine ışık tutacağını ayrıca İİAB sonucunda foliküler karsinom

şüphesi tespit edilen hastalarda ameliyat öncesi dönemde sitoloji preparatlarında TSHr metilasyonu incelenerek, foliküler adenom- karsinom ayırımında yeni bir değerlendirme kriterinin geliştirilebileceği kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Hanks, B.; Salomone, G. (2003): Thyroid. Sabiston Textbook of Surgery 18th Ed. W.B. Saunders Company. New York. 930- 934
2. Xing, M. (2007): Minireview: Gene Methylation in Thyroid Tumorigenesis, *Endocrinology* 148(3):948-953.
3. Venkataraman, G.M.; Yatin, M.; Marcinek, R.; Ain, K.B. (1999): Restoration of iodide Uptake in Dedifferentiated Thyroid Carcinoma: Relationship to Human Na/I Symporter Gene Methylation Status. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(7):2449-2457.
4. Rees, B.; McLachlan, S.M.; Furmaniak, J. (1988): Autoantibodies to the Thyrotropin Receptor. *Endocr Rev* 9:106–121.
5. Vassart, G.; Dumont, J.E. (1992): The Thyrotropin Receptor and the Regulation of Thyrocyte Function and Growth. *Endocr Rev* 13:596–611.
6. İnce, Ü. (2000): İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi Tekniđi. *Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık İstanbul.* 3:187-194.
7. Castro, M,R.; Gharib, H. (2005): Continuing Controversies in the Management of Thyroid Nodules. *Ann Intern Med* 142:926–931.
8. Caruso, G.; Tabarri, B.; Lucchi, I.; Tison, V. (1990): Fine Needle Aspiration Cytology in a case of Diffuse Sclerosing Carcinoma of the Thyroid. *Acta Cytol* 34:352–354.

9. Chia, S.; Milas, M.; Reddy, S.K.; Siperstein, A.; Skugor, M.; Brainard, J.; Gupta, K. (2007): Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Measurement in Blood as a Marker for Circulating Thyroid Cancer Cells and Its Role in the Preoperative Diagnosis of Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(2):468-475.
10. Sadler, G.P.; Clark, O.H. (1999): Thyroid and Parathyroid. Schwartz, S.I.; Shires, G.T.; Spencer, F.C. Principles of surgery, 7th Ed. McGraw-Hill. New York. 36:1661-1687.
11. Ureles, A.L. (1990): Thyroidology- Reflections on Twentieth Century History. Falk, S. Thyroid Disease. Raven Press. New York. 1: 1-14.
12. Ureles, A.L.; Freedman, Z.R. (1997): Thyroidology - Reflections on Twentieth Century History. Faik, S.A. Thyroid Disease Endocrinology Surgery Nuclear Medicine and Radiotherapy. 2nd Ed. Lippincott-Raven Publishers. New York. 1-14.
13. Kuran, O. (1993): Glandula Thyroidea. Sistemantik Anatomi, 3. Baskı. Filiz Kitapevi. İstanbul. 579-583
14. Skandalakis, J.E.; Skandalakis, P.N.; Skandalakis, L.J. (1990): Anatomy of the Thyroid Gland In Surgical Anatomy and Technique. Springer-Verlag. New York. 11-97
15. Dere, F. (1990): Glandula Thyroidea ve Parathyroidea. Arıncı, K.; Ersoy, M. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. Filiz Kitabevi. İstanbul. 497-500.
16. İşgör, A. (2000): Anatomi. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. İşgör, A. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul. 515-540.
17. Kaynaroğlu, Z.V. (2013): Tiroid Fizyolojisi ve Fonksiyon Testleri. Sayek, İ. Temel Cerrahi 4. Baskı. Güneş Kitabevi. Ankara. 167:1871-1876.

18. Tezelman, S.T.; Siperstein, A.E. (1997): Signal Transduction in Thyroid Neoplasms. Clark, O.H.; Duh, Q.Y. Textbook of Endocrine Surgery.WB Saunders. Philadelphia. 28: 214-227
19. Guyton, A.C. (1989): Tiroid Bezi ve Metabolik Hormonlar. Tıbbi Fizyoloji. 3. Baskı Nobel Kitabevi. Ankara. 2: 1293-1309.
20. Yıldırım, S.; İşgör, A. (2000): Tiroid Fonksiyon Testleri. İşgör, A. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul. 3: 139-52.
21. Tunçbilek, A. (2000): Direkt Radyografi, Bilgisayarlı Tomografi, Ultrasonografi, Renkli Doppler Ultrasonografi. İşgör, A. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık İstanbul. 3: 169-175.
22. Kaynaroğlu, Z.V (2013): Tiroid Nodüllerine Genel Yaklaşım. Sayek, İ. Temel Cerrahi 4. Baskı. Güneş Kitapevi. Ankara.168:1877-1881.
23. Noyek, A.M.; Finkelstein, D.M.; Witterick, I.J.; Kirsh, J.C. (1997): Diagnostic Imaging of the Thyroid Gland. Falk SH. Thyroid Disease. 2nd Ed. Lippincott Raven. Philadelphia. 9: 135-143.
24. Wilson A. G, O'Mara R.E. Uptake Tests, Thyroid and Whole Body Imaging with Isotopes. Falk SE. Thyroid Disease. Second Edition, Lippincot Raven, Philadelphia. 1997; 8: 113-131.
25. Cibas, E.S.; Ali, S.Z. (2009): The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Thyroid. 19(11):1159-1165.
26. Gagel, R.F.; Goepfert, H.; Gallewler, D.L. (1996): Changing Concepts In the Pathogenesis and Management of Thyroid Cancer. *CA Cancer J Clin* 46:261.
27. Udelsman, R. (1992): Thyroid Cancer. Cameron, J.L. Current Surgical Therapy. 4 th Ed. Mosby- Year Book, Inc. ST. Louis. 568-572

28. Altun, H.; Hamaloğlu, E. (2013): Diferansiye Tiroid Kanserleri. Sayek, İ.Temel Cerrahi 4. Baskı. Güneş Kitabevi. Ankara. 171:1897-1909.
29. Tezelman, S. (2000): Tiroid Tümör Agresivite Belirleyicileri. Ünal, G. Tiroid Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul. 290-298.
30. Ünal, G. (2000): Papiller Tiroid Kanseri. Ünal, G. Tiroid Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul. 336-348.
31. Finkel, M.; Splith, E. (2013): Thyroid Pathology. [www.studyblue.com/notes/note/n/thyroid-pathology/deck/2896035] Study Blue Inc. 16/04/2013.
32. Mc Cohaney, W.M.; Hay, I.D.; Woolner, L.B. (1986) Papillary Thyroid Carcinoma Treated by the Mayo Clinic, 1946, Through 1970: Initial Manifestations, Pathological Findings, Therapy and Outcome. *Mayo Clin Proc* 61: 976.
33. Thompson, N.W. (1994): Differentiated Thyroid Carcinoma. Wheeler, M.H.; Lazarus, J.H. Disease of the Thyroid. Chapman and Hall, London. 365-377.
34. Başkan, S.; Koçak, S. (2000): Papiller Tiroid Karsinomu, İşgör, A. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul. 8: 383-389.
35. Ünal, G. (2000): Diferansiye Tiroid Kanserinde Uzak Metastazların Tedavisi Ünal, G. Tiroid Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. İstanbul. 386-397.

36. Cooper, D.S.; Doherty, G.M.; Haugen, B.R.; Kloos, R.T.; Lee, S.L.; Mandel, S.J.; Mazzaferri, E.L.; McIver, B.; Pacini, F.; Schlumberger, M.; Sherman, S.I.; Steward, D.L.; Tuttle, R.M. (2009): American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 19:1167.
37. Doherty, G.M. (1997): Follicular Neoplasms of the Thyroid. Orlo, H.; Clark, M.; Quan Yang, D. Textbook of Endocrine Surgery. W.B Saunders Company. Philadelphia. 95- 96
38. Paphavasit, A.; Thompson, G.B.; Hay, I.D.; Grant, C.S. (1997): Follicular and Hurthle Cell Thyroid Neoplasms: Is Frozen-Section Evaluation Worthwhile? *Arch Surg.* 132:674.
39. Aydınтуğ, S. (2000): Foliküler Tiroid Karsinomları. İşgör, A. Tiroid Hastalıkları ve Cerrahisi. Avrupa Tıp Kitapçılık. İstanbul. 8: 391-396.
40. Watson, R.G.; Brennan, M.; Goellner, J.R. (1984): Invasive Hurthle Cell Carcinomas of the Thyroid. Natural History and Management. *Mayo Clin Proc.* 59: 851
41. Graff, J.R.; Greenberg, V.E.; Herman, J.G. (1998): Distinct Patterns of E-cadherin CpG Island Methylation in Papillary, Follicular, Hurthle's cell, and Poorly Differentiated Human Thyroid Carcinoma. *Cancer Res.* 58(10):2063-2066.
42. Davies, T.F.; Yin, X.; Latif, R. (2010): The Genetics of the Thyroid Stimulating Hormone Receptor: History and Relevance. *Thyroid.* 20(7):727-736.
43. Huntsman, D.G.; Caldas, C. (Mar 1999): Assignment1 of the E-cadherin gene (CDH1) to Chromosome 16q22.1 by Radiation Hybrid Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 83(1-2):82-3.

44. Graff, J.R.; Gabrielson, E.; Fujii, H.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. (2000): Methylation Patterns of the E-cadherin 5' CpG Island are Unstable and Reflect the Dynamic, Heterogeneous Loss of E-cadherin Expression During metastatic progression. *J Biol Chem.* 28;275(4):2727-2732.
45. Kim, G.W.; Zhu, X.; Kim, W. D.; Zhang, L.; Kebew, E.; Cheng, S. (2013): Reactivation of the Silenced Thyroid Hormone Receptor β Gene Expression Delays Thyroid Tumor Progression. *Endocrinology* 154:25-35.
46. Shrestha, M.; Crothers, B.A.; Burch, H.B. (2012): The impact of Thyroid Nodule Size on the Risk of Malignancy and Accuracy of Fine-Needle Aspiration: a 10-year Study from a Single Institution. *Thyroid.* 22(12):1251-1256.
47. Smith, J.A.; Fan, C.Y.; Zou, C.; Bodenner, D.; Kokoska, M. (2007): Methylation Status of Genes in Papillary Thyroid Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133(10): 1006-1011.
48. Xing, M.; Usadel, H.; Cohen, Y.; Tokumaru, Y.; Guo, Z.; Westra, B.W.; Tong, C.B.; Udelsman, R.; Sidransky, D. (2003): Methylation of the Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Gene in Epithelial Thyroid Tumors: A marker of Malignancy and Gene Silencing. *Cancer Research* 63,2316-2321.
49. Dai, Y.L.; Cai, D.H.; Chen, H.; Zhang, Y.; Li, J. (2010): Transcription and Promoter Hypermethylation of Thyroid Stimulating Hormone Receptor Gene in Human Papillary Thyroid carcinoma. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 30(1):114-117.