

Kuşkulu Tiroid Sitolojilerinde BRAF Mutasyonu ve Morfometrik Özellikler Arasında İlişki Olabilir mi?

Dr Sevdegül MUNGAN
KTÜ Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji AD
Trabzon

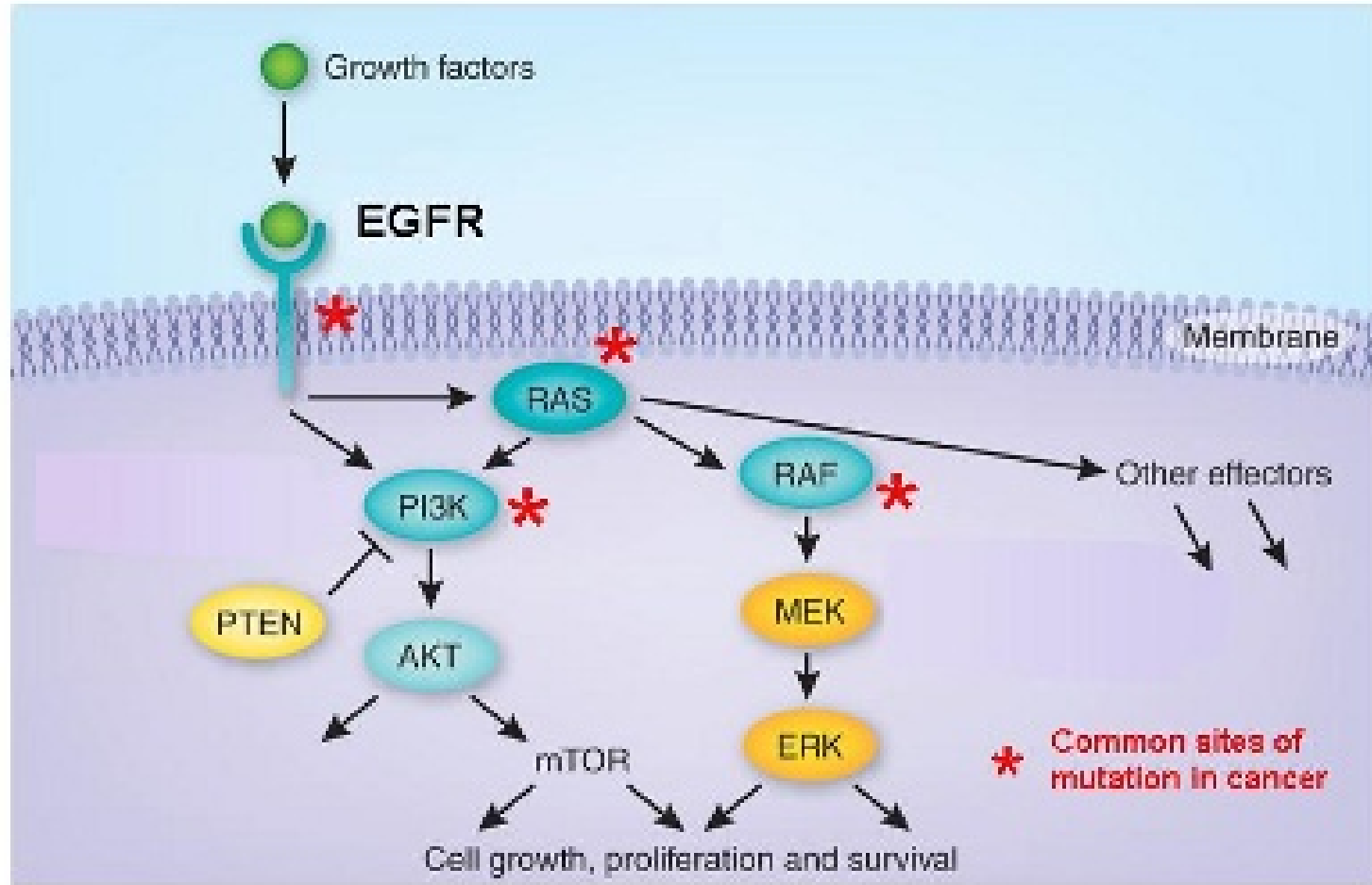
Mungan S, Ersöz S, Saygin İ, Cobanoğlu Ü



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





BRAF kinaz aktivasyonuna, sırasıyla MEK, ERK aktivasyonuna yol açar

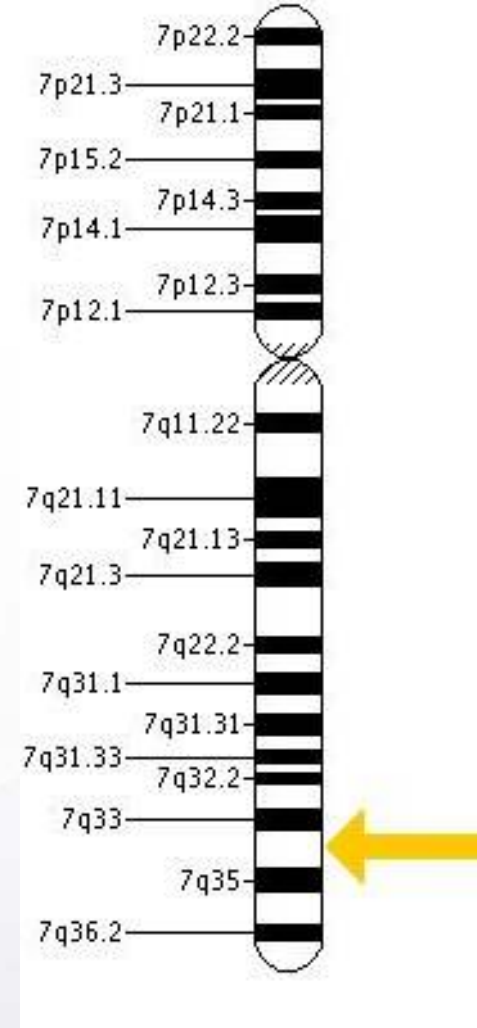


25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

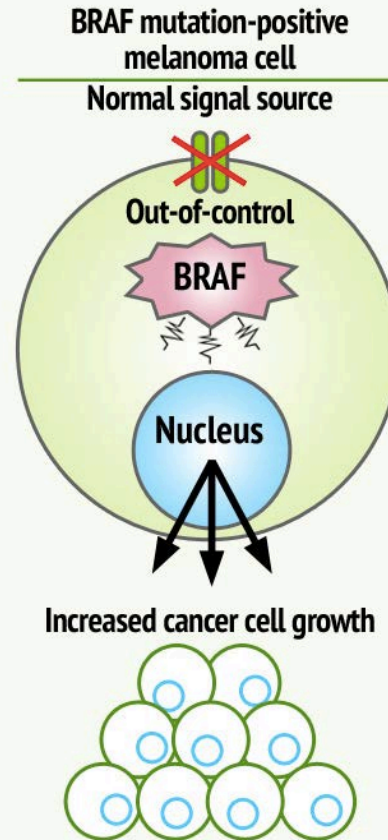
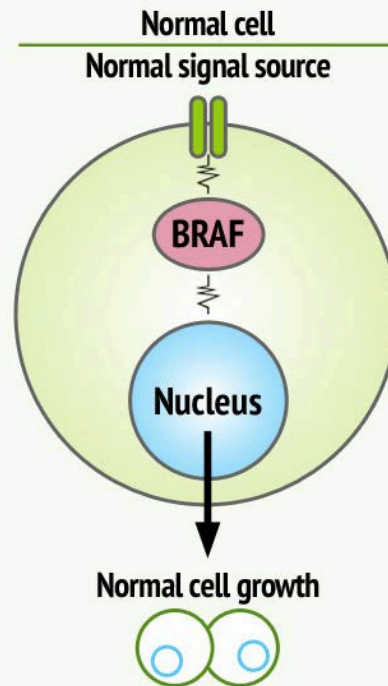
14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



BRAF Mutasyonu,
-7. kromozomun uzun
kolundaki,
-15. Ekzonun
-600. kodonun,
-1799. Nükleotiddeki
Nokta mutasyonudur.
Timin yerine Adenin geçer
Valin yerine Glu sentezlenir
(V600E)



BRAF V600E MUTATION



25 Ulusal Patoloji Kongresi
6 Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



RAF Mutasyonları



- **BRAF**, - V600E, - V600D,
- V600R, - V600K
- **CRAF**, - D594G,- G469E, - G469A

Inna V. Fedorenko et al. Biochem Pharmacol. 2011 August 1; 82(3): 201–209 Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma



25 Ulusal Patoloji Kongresi
6 Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



BRAF gen mutasyonları;

- PTK' daki en sık genetik değişiklik (%30-70)
- Malign melanoma (%30-50),
- Kolorektal kanser (%5-22)
- Seröz over karsinomu (%30)

*BRAF mutasyonlarının;
yaklaşık %93' ü V600E
%5' i V600K



Amaç

- Tiroid sitolojilerinin % 3-18 Kuşkulu? (AUS/FLUS)= Önemi belirsiz atipi
- En önemli tanı kriteri : sitolojik atipi
- BRAF mutasyonu malignite ve kötü prognozla ilişkili
- AMAÇ: BRAF mutasyonu ile hc çekirdeğinin biçimsel değişiklikleri arasındaki ilişkiyi morfometrik yöntem ile araştırmak



Materyal- Metod-1

- KTÜ Etik kurul konseyi: 2014/111
- KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD Arşivine ait Ocak 2010- Temmuz 2014 arasında
 - Bilateral total tiroidektomi sonrası PTK tanısı alan
 - Önceki İİAS tanısı AUS/FLUS olan 50 vaka çalışmaya dahil edildi



Materyal- Metod-2

- Papiller dışı histolojik subtipteki tiroid karsinomları
- Multisentrik tümör odakları içeren olgular çalışmaya dahil edilmedi
- Morfometrik çalışmalar sitoloji preparatlarından
- Moleküler testler ise tümörlü parafin bloklardan yapıldı



Materyal-Method-3

- 50 olgunun tumorlü parafin bloklarından 5 mikron kalınlığında 8' er kesit hazırlandı
- Kesitler 1-8 arasında numaralandırıldı
- 8. kesit HE, 7. kesit İHC ve ilk 6 kesit de DNA izolasyonu için kullanıldı
- Tekrarlar sonrasında DNA izole edilemeyen 2 olgu çalışma dışında bırakıldı
- Çalışmaya katılan olgu sayısı: 48



Morfometri-1

- Computerized morphometry system; MicroBrightField (USA) analiz yazılımı
- CooStereo Investigator 9, Computer Assisted Stereological Toolbox- Leica içeren bir bilgisayar (Pentium PC, DELL OptiPlex, USA),
- Araştırma mikroskopu (Leica, DM4000B-M, Germany), CCD camera (JVC, Japan),





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

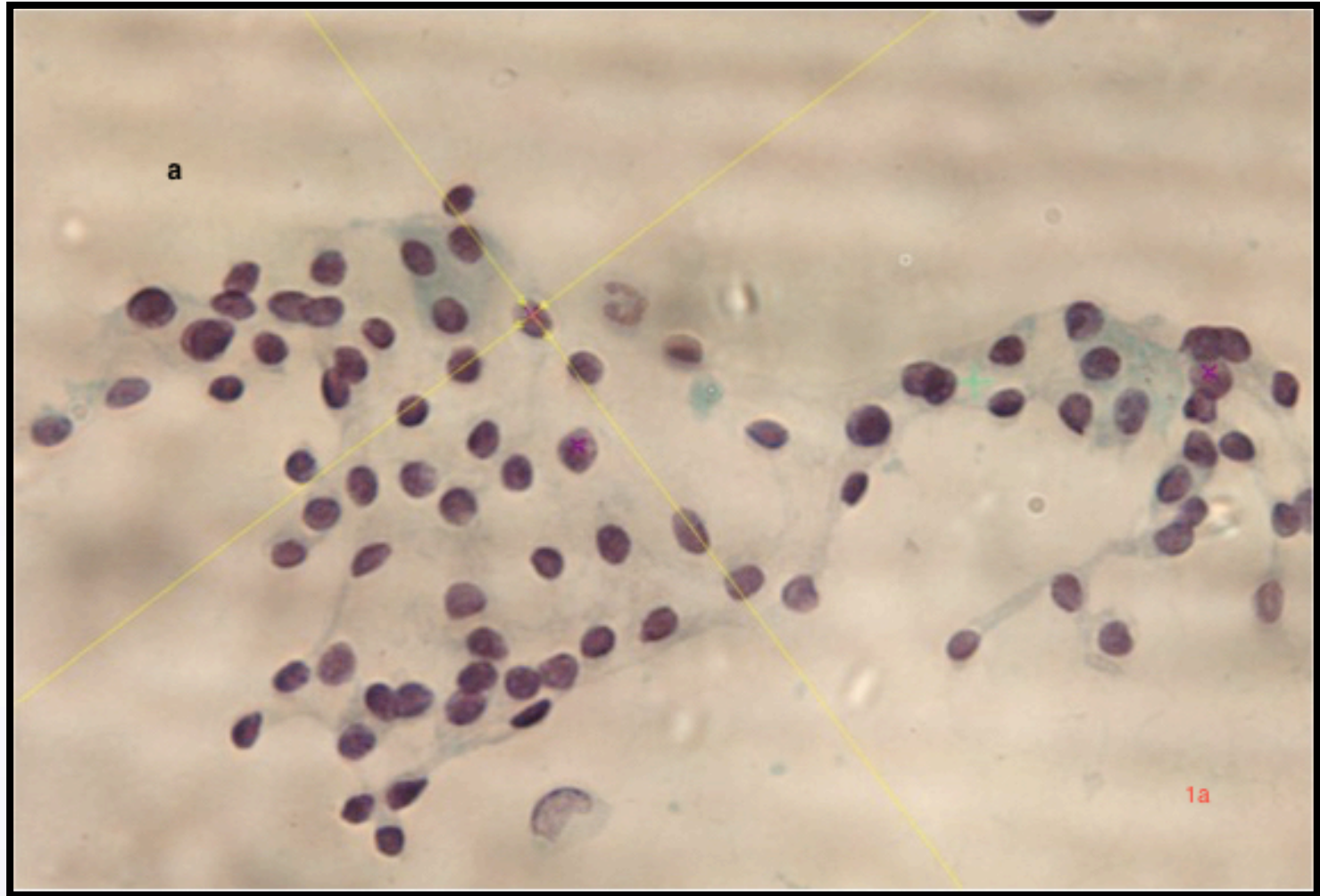
14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Morfometri-2

- Her preparattan ortalama kuşukulu 20 hücre (18- 30 hc) analiz edildi.
- Hücre çekirdeklerinin perimetre, nuclear area, roundness and nuclear shape factor değerleri morphometry software kullanılarak ölçüldü
- Daha sonra ortalamaları alınarak her vakaya ait mean morphometric data (perimetre, nuclear area, roundness and nuclear shape) belirlendi



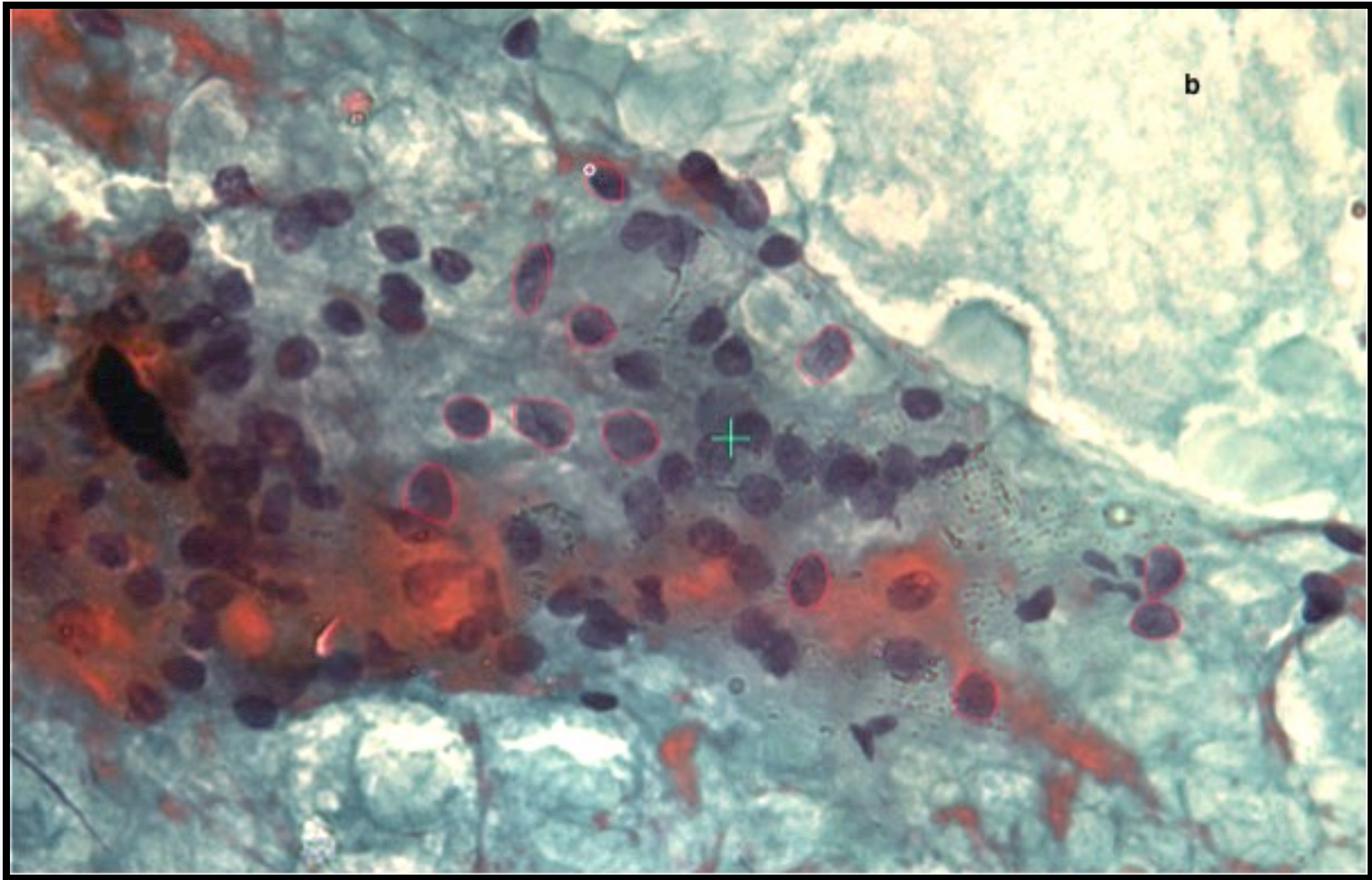


25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA





25. Ulusal Patoloji Kongresi

6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



DNA İzolasyonu ve BRAF Analizi

- BRAF mutasyonu iki farklı teknik ile test edildi
 - İmmünohistokimya
 - Real Time PCR



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



İmmünohistokimya-1

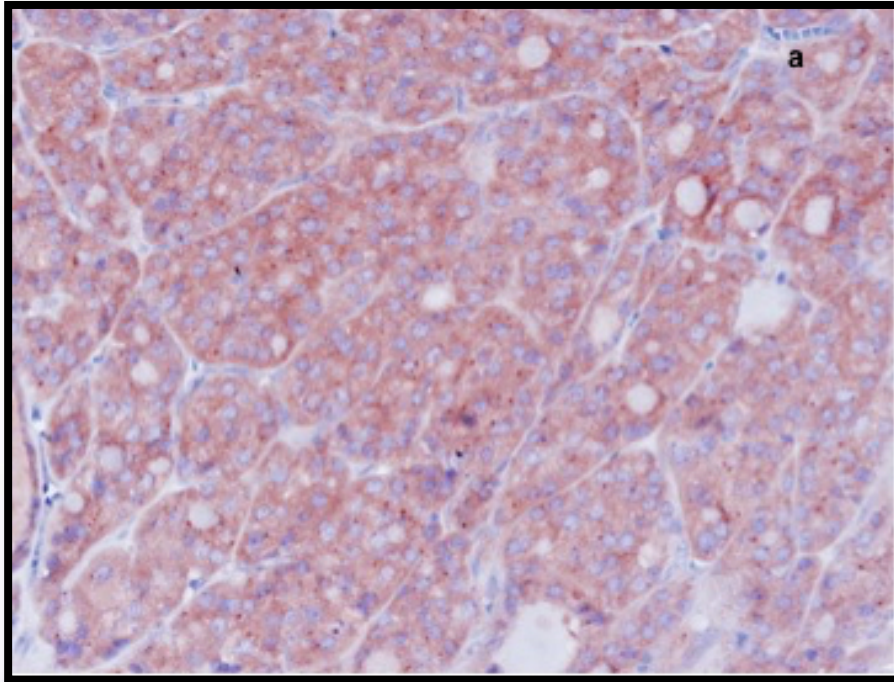
- 5-6 μm kalınlığında kesitler
- Monoklonal Ab kiti (*New East Biocciences, Anti BRAF V600E, Mouse Monoclonal Antibody*) kullanılarak
- Otomatik İHK boyama cihazı ile (*Ventana Medical Systems, Inc., Tuscon, AZ, USA*) boyandı



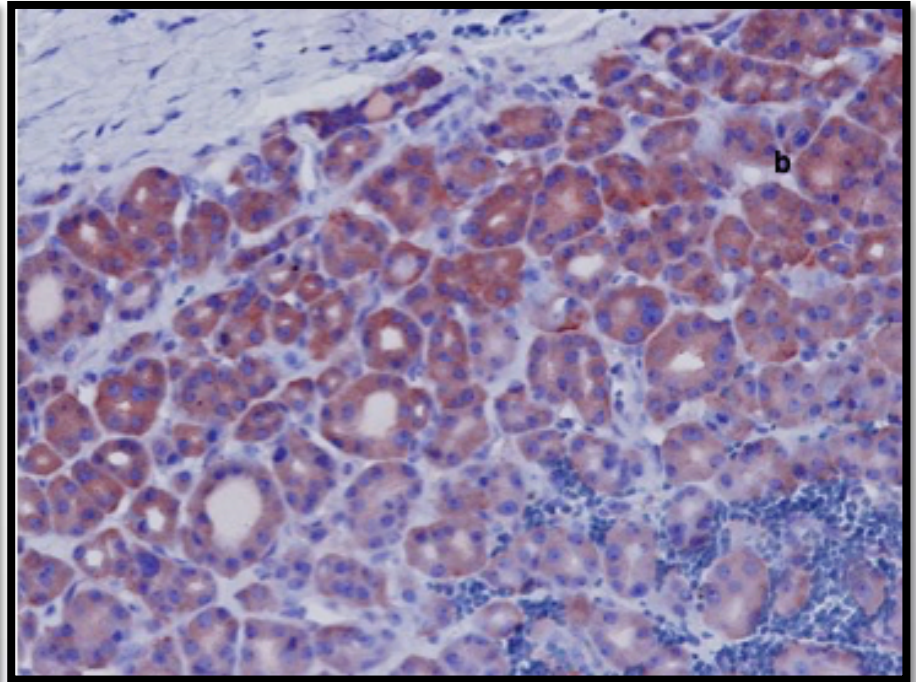
İmmünohistokimya-2

- 48 BRAF V600E IHK boyanmış preparattaki pozitif hücreler %0- %100 arasında skorlandı (0-2+).
- Skorlama yapılırken daha objektif olabilmek için Stereo Investigator dijital sayma programı kullanıldı
- Vakalar boyanma oranlarına göre 3 gruba ayrıldı. Score 0; %0-30, Score 1; % 30-60, Score 2; > %60.





Mutant



Wild

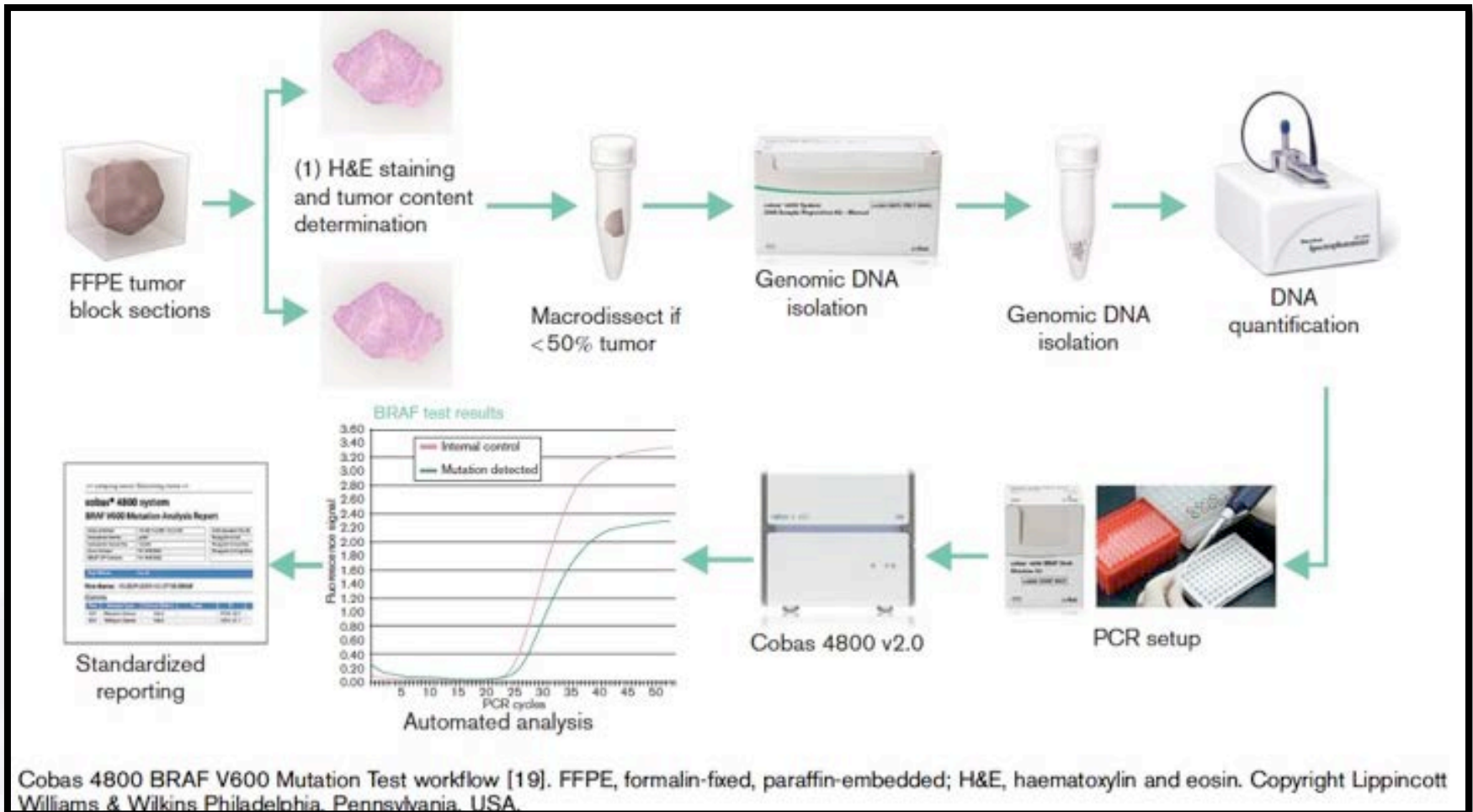


25 Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Real Time PCR



25 Ulusal Patoloji Kongresi
6 Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



SONUÇLAR



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Table 1. Hastaların demografik özellikleri (n=48).

		n (%)	BRAF pozitifliği, n (%)
		48	7
Cinsiyet	Kadın	36 (75)	5 (71.4)
	Erkek	12 (25)	2 (28.6)
Yaş (ort; aralık)		48 (19-62)	45 (28- 57)
Mikroskopik varyantlar	Foliküler	31 (64)	2 (28.6)
	Onkositik	11 (23)	3 (42.8)
	Klasik	4 (8)	2 (28.6)
	Warthin- benzeri	2 (5)	0
Tümör boyutu (ort; aralık)		1.5 cm (0.3- 3.7)	2 cm (1,1- 3,2)



Sonuçlar-2

- BRAF V600E mutasyonu saptanan olguların tamamı invaziv karsinomlardır
- Çalışmaya dahil edilen 21 mikrokarsinom olgusunda BRAF mutasyonu saptanmadı (Wild)



Sonuçlar-4

- **İmmünohistokimyasal çalışma sonuçları:**
 - Tamamı %30- 90 oranında boyandı (ortalama % 64)
 - 13 vakada skor 1 (%30-60), 35 vakada skor 2 >%60 boyanma
 - W/ M gruplar arasında İHK oranları açısından fark saptanmadı



Sonuçlar-3

- Mutant- Wild (M/W) grupların Morfometrik Bulgularından
 - Perimeter ($p= 0,0001$)
 - Nuclear area ($p= 0,0001$)değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu*.
- Roundness ($p= 0,752$) ve Shape Factor ($p= 0,681$) ile mutasyon varlığı arasında ilişki NEG.

* Student's T Test



25 Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Table 2. Mutant ve Wild gruplar arasındaki morfometrik verilerin analiz sonuçları

Morphometrik veriler	Wild tip (n= 41, 85.4%) <i>mean±SD</i>	Mutant tip (n=7, 14.6%) <i>mean±SD</i>	p Değeri
Perimeter	32.6±3.8	39.7±2.9	<0.001*
Nuclear shape	4.1±0.2	4.0±0.1	0.681
Roundness	0.6±0.0	0.6±0.0	0.752
Nuclear area	68.7±13.9	101.7±14.1	<0.001*

(**Hint:** *: statistically significant; SD: standard deviation)

Analizler Student t test ile yapıldı



Tartışma-1

- Nodüler guatr bazı bölgeler için endemik sorun
- İİAS algoritmada ilk basamak
- İİAS %20 maligniteyi dışlayamıyor (AUS/FLUS+ malignite kuşkusu)
- Tekrarlayan İİAS zaman kaybı veya gereksiz cerrahilere sebep olabiliyor
- Moleküler testler çare mi?



BRAF

- TPK larındaki en sık mutasyon BRAF, olumsuz prognostik belirteç
- TPK, en sık tiroid malignitesi
- BRAF' ı ucuza getirebilir miyiz?



Tartışma-2



- Sitolojik materyallerde incelenen en önemli komponent tiroisit çekirdeği
- Morfometri
- Morfometrik ölçümler daha çok follüküler tiroid lezyonları üzerinde yoğunlaşmıştır *
- Papiller karsinom ile ilgili az sayıda çalışma literatürde mevcuttur**



*A.J. Adeniran, P. Hui, D.C. Chhieng, et al, BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. Acta Cytologica 55 (2011) 570-575.

** J. Rosai, G. Tallini, Thyroid gland, in: J. Rosai (ed), Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 10th edn, El[10] T. Nagashima, M. Suzuki, M. Oshida, et al, Morphometry in the cytologic evaluation of thyroid follicular lesions cancer. Cytopathology 84 (1998) 115-118.



25 Ulusal Patoloji Kongresi
6 Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA



Table 1. Hastaların demografik özellikleri (n=48).

		n (%)	BRAF pozitifliği, n (%)
Cinsiyet	Kadın	36 (75)	5 (71.4)
	Erkek	12 (25)	2 (28.6)
Yaş (ort; aralık)		48 (19-62)	
Microscopik varyantlar	Foliküler	31 (64)	2 (28.6)
	Onkositik	11 (23)	3 (42.8)
	Klasik	4 (8)	2 (28.6)
	Warthin-benzeri	2 (5)	0
Tümör boyutu (ort; aralık)		1.5 (0.3-3.7)	



ÇIKARIM

- İstatistiksel olarak saptanan anlamlı fark nedeniyle **perimeter** ve **nuclear area** değerleri yüksek olan olgularda BRAF mut. olasılığının daha yüksek olduğu öngörülebilir
- Kısıtlı vaka sayısı çalışma için sınırlayıcı bir faktördür
- Saptanan anlamlı fark yeni çalışmalar için yol gösterici olabilir



References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 65 (2015) 5-29.
 - [2] E.S. Cibas, S.Z. Ali, The Bethesda System for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid.* 19 (2009) 1159-1165.
 - [3] A. [Chakraborty](#), A. [Narkar](#), R. [Mukhopadhyaya](#), et al, RAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma: significant association with node metastases and extra thyroidal invasion. [Endocr Pathol](#) 23 (2012) 83-93.
 - [4] F. Bhajjee, Y.E. Nikiforov YE, Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol* 22 (2011) 126-133.
 - [5] Li C, Aragon Han P, Lee KC, et al. Does BRAF V600E mutation predict aggressive features in papillary thyroid cancer? Results from four endocrine surgery centers. *J Clin Endocrinol Metab.* 98 (2013) 3702-3712.
 - [6] R. [Carr](#), B. [Ustun](#), D. [Chhieng](#), et al, Radiologic and clinical predictors of malignancy in the follicular lesion of undetermined significance of the thyroid. *Endoc. Pathol.* 24 (2013) 62-70.
 - [7] A.J. Adeniran, P. Hui, D.C. Chhieng, et al, BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration specimens enhances the predictability of malignancy in thyroid follicular lesions of undetermined significance. *Acta Cytologica* 55 (2011) 570-575.
 - [8] Y.E. Nikiforov, N.P. Otori, Papillary carcinoma, in: Y.E. Nikiforov (ed), *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid*, 2nd edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012, pp. 186-188.
 - [9] J. Rosai, G. Tallini, Thyroid gland, in: J. Rosai (ed), *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 10th edn, El[10] T. Nagashima, M. Suzuki, M. Oshida, et al, Morphometry in the cytologic evaluation of thyroid follicular lesions cancer. *Cytopathology* 84 (1998) 115-118.
 - [11] S.S. Priya, S. Sundaram, Morphology to morphometry in cytological evaluation of thyroid lesions. *J. Cytol.* 28 (2011) 98-102.
 - [12] S.R. Shih, Y.C. Chang, H.Y. Li, et al, Preoperative prediction of papillary thyroid carcinoma prognosis with the assistance of computerized morphometry of cytology samples obtained by fine-needle aspiration: preliminary report. *Head & Neck* 35 (2013) 28-34.
 - [13] H. Halait, K. Demartin, S. Shah, et al, Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol* 21 (2012) 1-8.
- sevier, 2011, pp. 488-538.



Teşekkürler...



25. Ulusal Patoloji Kongresi
6. Sitopatoloji Kongresi

14 - 17 Ekim 2015 / Merinos AKKM - BURSA

