



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

2016 DSÖ KLASİFİKASYONU İLE TANIMLANAN ‘MALİGNİTE
POTANSİYELİ BELİRSİZ ÜROTELYAL PROLİFERASYON’UN
PROGNOSTİK VE PREDİKTİF DEĞERİ ÜZERİNE
HİSTOMORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Dr. Münire ÇAĞIN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2019



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

2016 DSÖ KLASİFİKASYONU İLE TANIMLANAN ‘MALİGNİTE
POTANSİYELİ BELİRSİZ ÜROTELYAL PROLİFERASYON’UN
PROGNOSTİK VE PREDİKTİF DEĞERİ ÜZERİNE
HİSTOMORFOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Dr. Münire ÇAĞIN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Evrim ÖNDER
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

ANKARA/2019

TEŞEKKÜR

Patoloji uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak her konuda yol gösterici ve destekleyici olan, hayata bakış açısını ve hoşgörüsünü örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Murat ALPER'e,

Tezimin araştırma ve yazım sürecinde harcadığı zaman ve emeklerden dolayı kıymetli hocam ve ablam Doç. Dr. Evrim ÖNDER'e,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak eğitimime önemli katkılar sağlayan sayın hocalarım Doç. Dr. Ünsal HAN ve Doç. Dr. Ata TÜRKER ARIKÖK'e,

Asistanlığım süresince her türlü konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Ayşegül ADABAĞ, Uzm. Dr. Demet YILMAZER, Uzm. Dr. Aysun GÖKÇE, Uzm. Dr. Tuğba TAŞKIN TÜRKMENOĞLU, Uzm. Dr. Sehbâl ARSLANKOZ ve Uzm. Dr. Eşref DEMİR'e,

Asistanlığa başladığım ilk günden beri birlikte çalışmaktan ve arkadaşlıklarından büyük keyif aldığım, iyi ki varlar dediğim, her türlü zorluğu birlikte göğüslediğimiz tüm asistan arkadaşlarıma,

Büyük bir özveri ve gayretle çalışan sevgili laboratuvar çalışanlarımıza, sekreterlerimize ve tüm diğer çalışma arkadaşlarıma,

Anlayışı, sabrı ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan huzur kaynağım, sevgili eşim Ahmet ÇAĞIN'a, anneme, babama ve kardeşime,

Yaşama sevincim ve mutluluk kaynağım oğlum Eren Âsaf'a

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Münire ÇAĞIN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
RESİM LİSTESİ.....	viii
GRAFİK LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MESANENİN TEMEL ÖZELLİKLERİ	2
2.1.1. Embriyoloji.....	2
2.1.2. Anatomi.....	2
2.1.3. Histoloji ve Fizyoloji.....	3
2.2. MESANE TÜMÖRLERİ	5
2.3. MALİGNİTE POTANSİYELİ BELİRSİZ ÜROTELYAL PROLİFERASYON	7
2.3.1. Sınıflama	7
2.3.2. Klinik ve Lokalizasyon	8
2.3.3. Makroskopi.....	9
2.3.4. Histopatoloji	9
2.3.5. Genetik	10
2.3.6. İmmünohistokimya.....	10
2.3.7. Prognostik Faktörler	10

2.4. SİTOKERATİN 20	11
2.5. Ki67 ANTİKOR.....	11
2.6. P53 PROTEİN.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	13
3.1. VAKA GRUBUNUN TANIMLANMASI	13
3.2. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	13
3.3. MORFOMETRİK DEĞERLENDİRME	15
3.4. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA	16
3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	17
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	23
3.7. ETİK KURUL ONAYI	23
4. BULGULAR	24
4.1. KLİNİK BULGULAR	24
4.2. MORFOLOJİK BULGULAR.....	29
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	29
4.4. HERHANGİ BİR ZAMANDA VE / VEYA EŞ ZAMANLI NEOPLAZİ SAPTANAN VE SAPTANMAYAN OLGULARIN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	31
4.5. EŞ ZAMANLI NEOPLAZİ SAPTANAN VE SAPTANMAYAN OLGULARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI	34
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	44
EK 1. ÖZGEÇMİŞ	48
I- Kişisel Bilgiler	48
II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru).....	48

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru).....	49
IV- Mesleki Deneyimi	49
V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar	49
VI- Bilimsel İlgi Alanları.....	49
VII- Diğer Bilgiler	50
EK 2. TEZ KONUSU HAKEM DEĞERLENDİRME FORMU	52
EK 3. ETİK KURUL ONAYI.....	54
EK 4. CK20 DATASHEET.....	55
EK 5. Ki67 DATASHEET	58
EK 6. P53 DATASHEET	61

KISALTMALAR

AIC: Ancona International Consultation

Ark: Arkadaşları

CK: Sitokeratin

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

DSÖ/UÜPD: Dünya Sağlık Örgütü/ Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği

HBYS: Hastane bilgi yönetim sistemi

H&E: Hematoksilen & Eozin

İÜK, D: İnvaziv ürotelyal karsinom, düşük dereceli

İÜK, Y: İnvaziv ürotelyal karsinom, yüksek dereceli

MPBÜP: Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon

NİPÜK, D: Noninvaziv papiller ürotelyal karsinom, düşük dereceli

NİPÜK, Y: Noninvaziv papiller ürotelyal karsinom, yüksek dereceli

P53: Protein 53

DMPÜN: Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm

TUR: Transüretral rezeksiyon

ÜD: Ürotelyal displazi

ÜKİS: Ürotelyal karsinoma in situ

WHO: World Health Organization

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Üriner Sistem Tümörleri DSÖ Sınıflaması 2016 [5]	6
Tablo 2. 1998 DSÖ/UÜPD Sınıflaması ve 2002 Preneoplastik olmayan papiller intraepitelyal lezyonların sınıflandırması.....	7
Tablo 3. Kullanılan antikorların özellikleri	17
Tablo 4. CK20 boyanma paterninin değerlendirmesi	19
Tablo 5. P53 boyanma paterninin değerlendirilmesi.....	21
Tablo 6. Ki67 boyanma paterninin değerlendirilmesi.....	22
Tablo 7. Olguların demografik ve klinik özellikleri.....	24
Tablo 8. MPBÜP ile eş zamanlı ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki.....	25
Tablo 9. Neoplazi ile birlikte olan olguların tümör derecesi ve invazyon özellikleri açısından dağılımları	26
Tablo 10. MPBÜP ile öncesi ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki.....	27
Tablo 11. MPBÜP ile sonrası ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki	27
Tablo 12. Morfolojik bulgular	29
Tablo 13. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları.....	30
Tablo 14. Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre ondülasyon ve inflamasyon yönünden olguların karşılaştırılması	31
Tablo 15. Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden olguların karşılaştırılması.....	32
Tablo 16. Tümör derecelerine göre nükleus çaplarının karşılaştırılması	32
Tablo 17. Neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı ölçümleri ile söz konusu ölçümlere ait ROC eğrisi altında kalan alan ve %95 güven aralıkları	34
Tablo 18. Eş zamanlı neoplazi saptanan ve saptanmayan olguların immünohistokimyasal boyanma paternlerinin karşılaştırılması	35

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mesanenin topografik anatomisi (Kadın:midsagittal kesit) [16]	3
Şekil 2. Mesane: kontrakte mukoza (transvers kesit), H&E [18]	4
Şekil 3. Olguların neoplazi ile birliktelikleri (eş zamanlı/öncesi/sonrası)	28



RESİM LİSTESİ

- Resim 1.** A) Papiller ürotelyal hiperplazi, H&E, x40. B) Flat ürotelyal hiperplazi, H&E, x200. 8
- Resim 2.** A) Geniş ondülasyon gösteren kalınlaşmış ürotelyum, H&E, x40. B) Dar ondülasyon gösteren kalınlaşmış ürotelyum ve lamina propria dilate konjesyone kapiller yapılar, H&E, x100. 9
- Resim 3.** A) Flat lezyon, H&E, x100. B) MPBÜP (kırmızı ok) komşuluğunda düşük dereceli papiller neoplazm (mavi ok), H&E, x40 10
- Resim 4.** A) İnflamasyon var, H&E, x100. B) İnflamasyon yok, H&E, x100. 14
- Resim 5.** A) Flat /ondülasyon yok, H&E, x100. B) Ondülasyon var, H&E, x100.... 14
- Resim 6.** Flat (A) ve ondülan (B) lezyonda ürotelyum kalınlığı ölçümü, H&E, x100. 15
- Resim 7.** Nükleus çapı ölçümü, H&E, x200 (A), x400 (B). 16
- Resim 8.** Karsinoma in situ komşuluğunda (mavi ok) MPBÜP (kırmızı ok); A) P53 immünreaksiyonu, x40. B) Ki67 immünreaksiyonu, x40. 18
- Resim 9.** Düşük dereceli papiller neoplazi komşuluğunda (mavi ok) MPBÜP (kırmızı ok) A) CK20 immünreaksiyonu, x40. B) P53 immünreaksiyonu, x40. 18
- Resim 10.** CK20 ile yüzeyel (A), epitel ortasına kadar (B) ve tam kat (C) boyanma, x100. 19
- Resim 11.** P53 ile hiç boyanma olmaması (A); az sayıda hücrede (B), 1-2 sıra hücrede (C) ve 2 sıradan fazla hücrede (D) boyanma, x100. 20
- Resim 12.** Flat (A) ve ondülan (B) lezyonda Ki67 ile bazal az sayıda hücrede boyanma, x100. 20
- Resim 13.** Ki67 ile 1-2 sıra hücrede (A) ve 2 sıradan fazla hücrede (B) boyanma x100. 21

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1.** MPBÜP'un eş zamanlı ve herhangi bir zamanda neoplazi ile birlikteliği 25
- Grafik 2.** Neoplazi ile birlikte olan olguların tümör derecesi ve invazyon özellikleri açısından dağılımları 26
- Grafik 3.** Tümör derecelerine göre nükleus çaplarının dağılımı. 33



ÖZET

Amaç: Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon 2016 Dünya Sağlık Örgütü üriner sistem tümörleri klasifikasyonunda ilk kez tanımlanan bir terminolojidir. Bu olgular daha önce genellikle ürotelyal hiperplazi başlığı altında değerlendirilmiş ya da prognostik bir değer taşımadığı öngörüldüğünden tanısal açıdan patolog tarafından spesifiye edilmemiştir. Yapılan genetik çalışmalar bu lezyon grubunun malignite ile ilişkili olabileceğini öngörmektedir. Bununla beraber literatürde malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyonun histopatolojik özellikleri ve karsinom ile birlikteliğini araştıran az sayıda çalışma vardır. Bu doğrultuda söz konusu lezyonların rutin tanısı açısından da, patoloğlar açısından da güçlükler yaşanmaktadır. Biz de çalışmamızda malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon olgularının maligniteye progresyonu ve/veya birlikteliği ve malignite ile ne düzeyde korelasyon gösterdiğini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada 2007-2016 yılları arasındaki tüm mesane TUR materyaline ait Hematoksilen&Eozin boyalı lamalar retrospektif olarak iki gözlemci tarafından ışık mikroskopunda incelenmiştir. Yeniden değerlendirmede malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon tespit edilen 91 vakada morfometrik olarak ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı ölçülmüştür. Ayrıca inflamasyon, ondülasyon varlığı değerlendirilmiş ve bu vakalara ek olarak CK20 (Ks20.8), p53 (DO-7) ve Ki67 (MİB-1) uygulanmıştır. Tüm verilerin malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon ile ilişkisi ve maligniteye progresyonu ve/veya birlikteliği ve malignite ile ne düzeyde korelasyon gösterdiği istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Olguların 79'ü erkek, 12'si kadın ve yaş ortalaması 66,7 (yaş aralığı 33-88)'dir. 91 olgunun 23'ünde öncesinde neoplazi mevcut olup bunların 20'si (%86,9) düşük dereceli ürotelyal neoplaziydi. En az 6 ay takibi olan 59 olgunun 27'sinde sonrasında neoplazi saptanmış ve bunların 17'si (%63) düşük dereceliydi. Eş zamanlı neoplazisi olmayan 24 olgunun; öncesinde neoplazi olan 5 olgudan 3'ünde, öncesinde neoplazi olmayan 19 olgudan ise 1'inde sonrasında neoplazi saptanmıştır. Bu 3 olgu nüks şeklinde görülürken 1 olgu ise ilk tanısı ürotelyal hiperplazi iken bu tanıdan 33 ay sonra yapılan biyopsisinde düşük dereceli ürotelyal

neoplazi saptanmıştır. 91 olgunun 82'sinde (%90,1) epitelde ondülasyon izlenmiş, 51'inde (%56) inflamasyon saptanmıştır. Eş zamanlı neoplazi ile birlikte olan (30 olgu) ve olmayan (21 olgu) olgular arasında inflamasyon varlığının anlamlı bir etkisi olup ($p<0,001$) neoplazi gözlenmeyen olgularda inflamasyon daha yüksek oranda görülmektedir. Lezyonda ortalama ürotelyum kalınlığı 192,03 μm ve ortalama nükleus çapı 7,73 μm olup neoplazi birlikteliği ile nükleus boyutu, ürotelyum kalınlığı arasında ilişki saptanmamıştır. CK20 ile anormal boyanma gözlenen 13 vakanın 11'i, P53 pozitif saptanan 6 vakanın 3'ü, Ki67 ile yüksek proliferatif aktivite gözlenen 5 vakanın 4'ü eş zamanlı neoplazi ile birlikte. Ancak neoplazi birlikteliği ile CK20, P53 ve Ki67 boyanma özellikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Sonuç: Çalışmamızda malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon olgularının %80,2'sinde (73 olgu) neoplazi ilişkisi saptanmış olup; öncesi, eş zamanlı ve sonrasında en sık ilişki gösteren neoplazinin düşük dereceli ürotelyal neoplazi olduğu görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELE: İmmünohistokimya, Mesane, Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon, Morfometrik analiz

ABSTRACT

Purpose: Urothelial proliferation of uncertain malignant potential is first defined in the World Health Organization 2016 classification of urinary system tumours. Before this classification these lesions were evaluated under the title of urothelial hyperplasia and since there were no information suggesting their malignancy potential, the pathologists were not so meticulous in specifying these lesions. In our study, we aimed to define the histopathological immunohistochemical and morphometric features of urothelial proliferation of uncertain malignant potential and its relation with urothelial tumours.

Materials and Methods: In this study, Hematoxylin & Eosin stained slides of bladder TUR materials between 2007-2016 were retrospectively examined by two observers under light microscope. Urothelial proliferation of uncertain malignant potential was detected in 91 cases and histomorphological, morphometric and immunohistochemical features were noted. Morphometric analysis was performed by measuring epithelial thickness and nuclear diameter, for immunohistochemical evaluation CK20 (Ks20.8), P53 (DO-7) and Ki67 (MIB-1) were applied. Any relationship between urothelial proliferation of uncertain malignant potential and the urothelial tumours (either synchronously or asynchronously) were statistically analyzed.

Results: There were 79 males, 12 females and the mean age was 66.7 (range 33-88). Among 91 cases, 23 had prior neoplasms, 86.9% of which were low-grade urothelial neoplasms. After allowing for a minimum of 6 months of follow up, 27 patients had subsequent neoplasms, 63% which were low grade. Among 24 cases that have no concomitant neoplasia; 5 had previous neoplasm and 3 of these 5 cases also had tumour in subsequent tissue sampling. On the other hand among 19 cases, only 1 had tumour in subsequent tissue sampling. Out of 91 cases, 82 (90.1%) had epithelial undulation and 51 (56%) had inflammation. Inflammation was found to have a significant effect ($p < 0.001$) between cases with concomitant neoplasia (30 cases) and non-concomitant (21 cases). The mean urothelium thickness in the lesion was 192,03 μm and the mean nucleus diameter was 7,73 μm . No association was found between neoplasia and nucleus size, urothelium thickness. 11 of 13 cases with

abnormal CK20 staining, 3 of 6 cases with P53 positive and 4 of 5 cases with high proliferative activity with Ki67 were associated with concurrent neoplasia. However, there was no statistically significant correlation between neoplasia and CK20, P53 and Ki67 staining.

Conclusion: In our study, neoplasia was found in 80.2% (73 cases) cases with urothelial proliferation of uncertain malignancy potential; low - grade urothelial neoplasia was the most common neoplasm.

KEYWORDS: Bladder, Immunohistochemistry, Morphometric analysis, Urothelial Proliferation of Uncertain Malignancy Potential



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon (MPBÜP) Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2016 üriner sistem tümörleri klasifikasyonunda ilk kez tanımlanan bir terminolojidir [1]. Önceki klasifikasyonda (DSÖ 2004) flat ürotelyal hiperplazi ve papiller ürotelyal hiperplazi olarak değerlendirilen bu lezyonların neoplastik bir sürecin parçası olabileceği yönünde ortaya çıkan bazı bulgular nedeni ile yeni klasifikasyonda MPBÜP başlığı altında değerlendirilmeye başlanmıştır [1-3]. MPBÜP kalınlaşmış ürotelyumdan oluşan ve gerçek papilla içermeyen lezyonlardır. Ondülasyon sık görülür. Hücreler minimal sitolojik atipili ya da atipisizdir, polaritesi korunmuştur ve hücreler normal nükleus sitoplazma oranına sahiptir [1, 4, 5]. Epidemiyolojisi hakkında yapılan çalışmalar kesin veriler ortaya koyamamıştır [4]. Ancak patogenezinde en sık kromozom 9q delesyonu [3, 6, 7] ve bunu takiben 9p ve 18q delesyonu görülmektedir [3]. Ayrıca 17p kromozomunda delesyon sonrası oluşan P53 geninde kayıp ve tümör süpressör genindeki (CDKN2N) bir kopyanın kaybıyla oluşan kromozom 9p değişimi de yer almaktadır [1, 4]. Benzer şekilde P53 gen inaktivasyonu kromozom 17p' nin heterozigot kaybı erken karsinoma insitu ve sıklıkla invaziv tümörlerde meydana gelmektedir. Buna karşılık kromozom 9q delesyonu sıklıkla papiller karsinomlarda ve flat ürotelyal lezyonlarda bulunmaktadır [8, 9].

MPBÜP'ün sıklıkla öncesinde karsinom öyküsü olan hastalarda ya da papiller lezyonların komşuluğunda görüldüğü yönünde çalışmalar vardır [2, 10]. Mesanenin nonkanseroz ve noninvaziv lezyonlarının biyolojik davranışının anlaşılması ve doğru ayırıcı tanının konulması prognoz açısından önem taşımaktadır [4]. Bu nedenle mesane neoplazilerinde çok sayıda belirteç tümör tanısı, rekürens, progresyon, invaziv hastalık, tedaviye cevap ile ilgili araştırılmıştır [8]. Bunlardan pratikte en sık kullandığımız belirteçler CK20, Ki67 ve P53'tür.

Biz de bu çalışmada MPBÜP olgularının malignite ile ne düzeyde korelasyon gösterdiğini araştırmayı ve immünohistokimyasal olarak CK20, P53, Ki67 çalışılarak morfolojik ve immünohistokimyasal bulguları hastaların takip verileri (neoplazi var/yok) eşliğinde analiz etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANENİN TEMEL ÖZELLİKLERİ

Mesane, esas işlevi idrar depolamak olan kese şeklinde, kas yapısı nedeniyle içindeki idrar hacmine uyum sağlayarak büyüyeabilen bir organdır. Her organda olduğu gibi mesanenin de benign ve malign lezyonları mevcuttur. Bu hastalıkların birçok açıdan yeterince iyi anlaşılabilmesi için organın embriyoloji, anatomi, histoloji ve fizyolojisi iyi bilinmelidir.

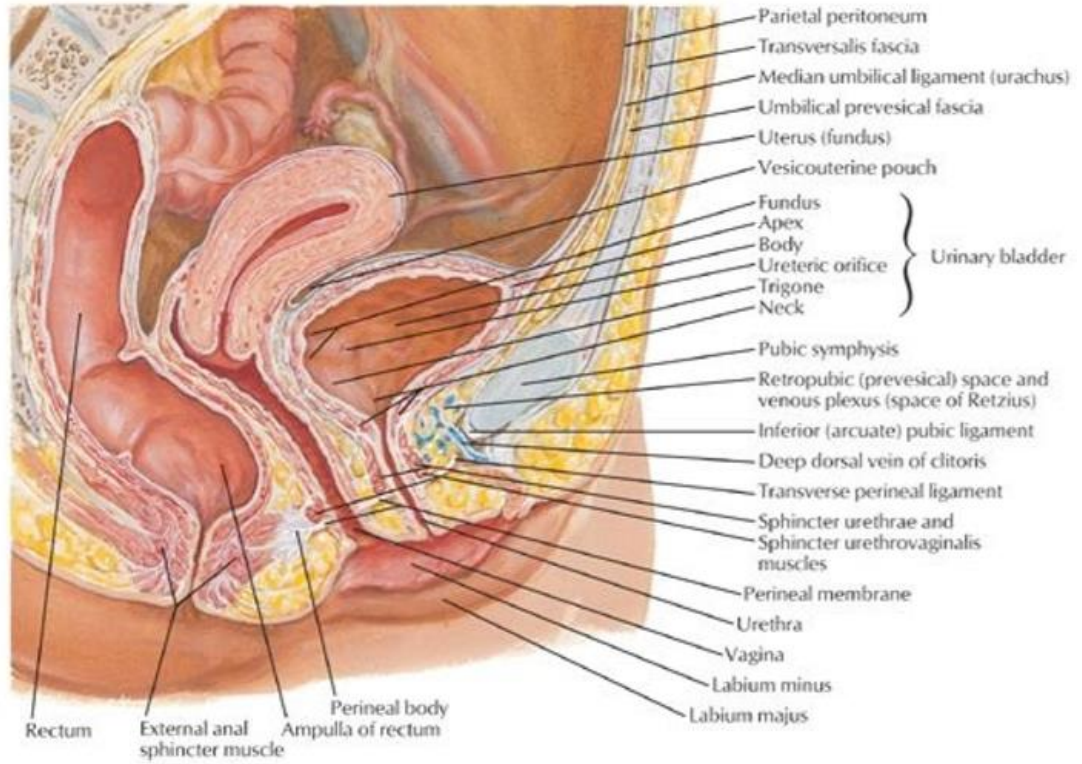
2.1.1. Embriyoloji

Embriyonel hayatta kloaka sindirim ve boşaltım sistemini oluşturmak üzere farklılaşmaktadır. Kloaka ürorektal septum tarafından dorsal rektum ve ventral ürogenital sinüs olarak ayrılır [11]. Mesane ve üretra epiteli tamamen ürogenital sinüsün endoderminden gelişirken lamina propria, muskularis propria ve adventisya çevreleyen splenik mezenkimden gelişir. Erken embriyolojik gelişim sırasında mezonefrik kanalların kaudal kısımları mesane trigonu mukozasının oluşumuna katkıda bulunur ancak sonunda endoderm ile yer değiştirir [12].

2.1.2. Anatomi

Mesanenin yeri şekli, pozisyonu ve komşu organlarla ilişkisi içindeki idrar miktarına ve yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yetişkin mesanesi ortalama 350-450 ml'lik bir kapasiteye sahiptir. Yetişkinde boş idrar kesesi, pelvis minörün anteroinferior kısmı içinde, peritondan aşağı doğru uzanır. Bebeklerde mesane abdomende yer alır, 6 yaş civarı pelvis majör içine girer. Pelvis minör'e puberteden sonra iner [11, 13, 14].

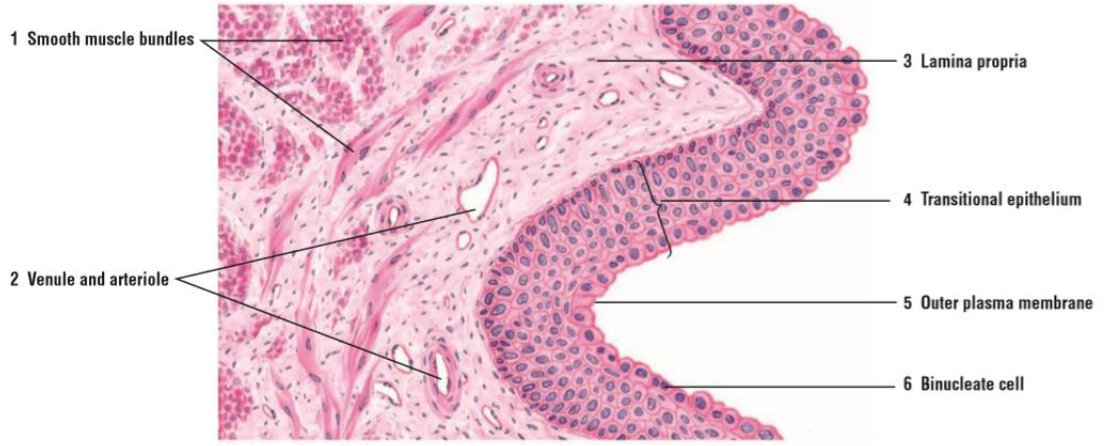
Erkeklerde mesane posteriorda seminal veziküller, vas deferensler ve rektumla komşudur. Mesane ile rektum arasına kadınlarda uterus ve vajina yerleşmiştir, kubbe ve arka yüzeyleri peritonla kaplı olduğundan bu bölgede mesane ince barsak ve sigmoid kolonla yakın komşuluk içindedir (Şekil 1) [15].



Şekil 1. Mesanenin topografik anatomisi (Kadın:midsagittal kesit) [16]

2.1.3. Histoloji ve Fizyoloji

Mesane üç düz kas tabakasına sahip kalın duvarlı kese şeklinde bir organdır. Kese lümenini 5-7 katlı ürotelyum (değişici epitel) döşer. Üç tabakası vardır: yüzeysel, intermedier ve bazal tabaka. Yüzeysel tabaka hücreleri alçak kübik veya prizmatik biçimlidir ve sıklıkla multinükleerdir. Bu hücrelere şemsiye hücreleri denir. İntermedier tabaka 2-3 sıra poligonal hücrelerden oluşur. Bazal tabaka 2-3 sıra küçük kuboidal hücrelerden oluşur [11, 17]. Epitelin altında lamina propria, daha sonra longitudinal, sirküler ve longitudinal olmak üzere düzenlenmiş düz kas tabakası mevcuttur (Şekil 2). En dışta seroza üst yüzeyi döşerken alt yüzey adventisya ile örtülüdür. Değişik çaplarda çok sayıda kan damarları serozada düz kas demetleri arasında ve lamina propriada bulunur [11, 17, 18].



Şekil 2. Mesane: kontrakte mukoza (transvers kesit), H&E [18]

Mesanenin esas işlevi idrar depolamaktır. Ürotelyum ile döşeli olduğundan mesane idrar ile dolarken esneyebilir ve genişleyebilir. Epiteldeki hücreler artan idrar hacmine uymak için 2-3 hücre tabakalı ince ve yassı bir hal alır. Bu değişiklikler şemsiye hücrelerinin hücre zarlarındaki plaklar olarak adlandırılan özgül kalınlaşmış bölgeler sayesinde. Bu hücrelerde ayrıca hücre zarı daha kalındır. Ek olarak desmozomlar sıkı bağlantılarla hücrelerin yan yüzeylerinde birbirlerine tutunurlar. Epitel tam gerildiğinde bile suya tuzlara ve idrara geçirgen olmayıp idrar ile alttaki bağ dokusu arasında etkili bir bariyer oluşturur [18].

2.2. MESANE TÜMÖRLERİ

Dünyada görülen kanserlerin %3'ünü mesane kanserleri oluşturmaktadır [19] Ürotelyal karsinomlar mesane kanserleri arasında en sık karşılaşılan subtiptir, kanserlerin sıklık sıralamasında 7., sadece erkekler dikkate alındığında ise 4. sırada yer almaktadır ve erkeklerde kanser ilişkili ölümlerin 9. en sık nedenini oluşturmaktadır [5, 19].

Mesane kanserleri erkeklerde 3-4 kat fazla görülmektedir. Ortalama tanı yaşı 65-70'dir. Etiyolojik faktörler arasında genetik yatkınlığın dışında, mesleki karsinojenler, sigara, kronik infeksiyonlar, mesanede taş veya yabancı cisimler, pelvik radyasyon ve kemoterapi yer almaktadır.

Mesane tümörlerinin %80-90'ını ürotelyal karsinomlar oluşturmaktadır. Tanı anında vakaların %70-80'i noninvaziv ya da erken invaziv (Ta, Tis, T1) tümörlerdir [5].

2016 DSÖ sınıflamasına göre ürotelyal tümörler infiltratif ürotelyal karsinomlar ve non-invaziv ürotelyal lezyonlar olmak üzere iki kategoride incelenmektedir. Non-invaziv ürotelyal lezyonlar; ürotelyal karsinoma in situ (ÜKİS), yüksek dereceli non-invaziv papiller ürotelyal karsinom (NİPÜK,Y), düşük dereceli non-invaziv papiller ürotelyal karsinom (NİPÜK,D), düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm (DMPÜN), MPBÜP, ürotelyal displazi (ÜD), ürotelyal papillom ve inverted ürotelyal papillom olmak üzere sekiz alt sınıfa ayrılmaktadır (Tablo 1) [5].

Tablo 1. Üriner Sistem Tümörleri DSÖ Sınıflaması 2016 [5]

ÜROTELYAL TÜMÖRLER İnfiltratif Ürotelyal Karsinomlar Nested Mikrokistik Mikropapiller Lenfoepitelyoma benzeri Plazmasitoid/Taşlı yüzük hücreli/ Diffüz Sarkomatoid Dev hücreli Az differansiye Lipid-zengin Şeffaf hücreli	MÜLLERİAN TİP TÜMÖRLER Şeffaf hücreli Karsinom Endometrioid Karsinom
Non-invaziv Ürotelyal Lezyonlar Ürotelyal karsinoma in situ Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, düşük dereceli Non-invaziv papiller ürotelyal karsinom, yüksek dereceli Düşük malignite potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm Ürotelyal papillom İnverted ürotelyal papillom Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon Ürotelyal displazi	NÖROENDOKRİN TÜMÖRLER Küçük hücreli nöroendokrin karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom İyi diferansiye nöroendokrin tümör Paraganglioma
	MELANOSİTİK TÜMÖRLER Malign Melanom Nevus Melanozis
	MEZENKİMAL TÜMÖRLER Rabdomyosarkom Leiomyosarkom Anjiosarkom İnflamatuar miyofibroblastik tümör Perivasküler epitelioid hücreli tümör Benign Malign Soliter fibröz tümör Leiomyom Hemanjiom Granüler hücreli tümör Nörofibrom
SKUAMÖZ HÜCRELİ NEOPLAZİLER Pür Skuamöz Hücreli Karsinom Verrüköz Karsinom Skuamöz Hücreli Papillom	ÜROTELYAL TRAKT HEMATOPOETİK VE LENFOİD TÜMÖRLER
GLANDÜLER NEOPLAZİLER Adenokarsinom, NOS Enterik Müsinöz Mikst	DİĞER TÜMÖRLER Skene, Cowper ve Litre glandlarının tümörleri Metastatik ve diğer organlardan yayılım yoluyla gelen tümörler Üst üriner traktın epitelyal tümörleri Divertikül kaynaklı tümörler Üretranın ürotelyal tümörleri
Villöz Adenom	
URAKAL KARSİNOM	

2.3. MALİGNİTE POTANSİYELİ BELİRSİZ ÜROTELYAL PROLİFERASYON

2.3.1. Sınıflama

Noninvaziv ürotelyal lezyonlar primer mesane neoplazmlarının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır [5]. Bu lezyonların sınıflaması hakkında yıllar içinde revizyonları da içeren farklı klasifikasyon şemaları yayınlanmıştır [20-22]. Morfolojik olarak bu lezyonlarda iki temel farklı fakat birbiriyle ilişkili büyüme paterninin [5, 8] tanımlandığı mesanenin noninvaziv ürotelyal lezyonlarının ayrıntılı sınıflamasını içeren 1998 Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (DSÖ/UÜPD) klasifikasyonu [22] 1999 DSÖ tarafından kabul edilmiştir (Tablo 1). Bu sistemin en önemli getirilerinden biri spesifik sitolojik ve arkitektürel kriterler kullanılarak ayrıntılı histolojik tanımlamaların verilmiş olması ve gözlemciler arası tanı farklılığını en aza indirmesidir. 2002 yılında ‘Ancona International Consultation (AIC)’u baz alan flat intraepitelyal lezyonların ayrıntılı sınıflandırılması Lopez Beltran ve arkadaşları (ark.) tarafından yayınlanmıştır (Tablo 2) [20]. 2004 DSÖ sınıflandırması ise 1998 DSÖ/UÜPD sınıflandırmasına dayanmaktadır ve son sınıflandırmaları birleştirmektedir.

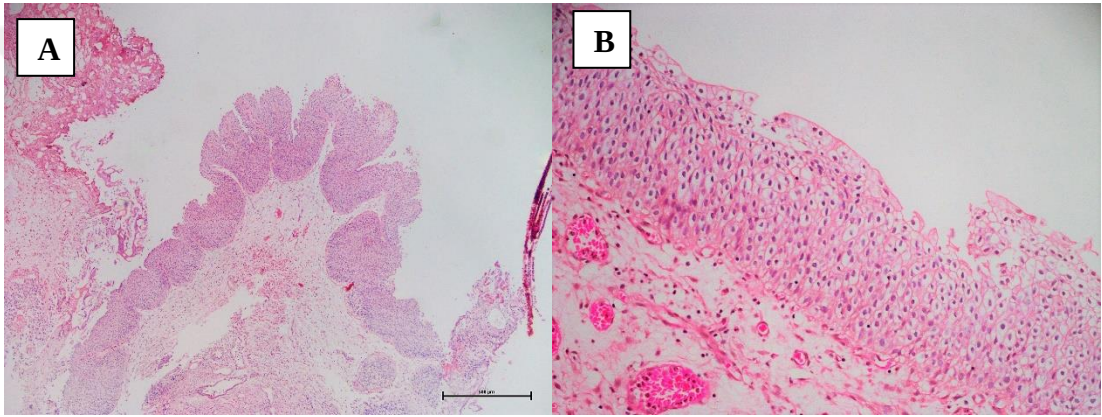
Tablo 2. 1998 DSÖ/UÜPD Sınıflaması ve 2002 Preneoplastik olmayan papiller intraepitelyal lezyonların sınıflandırması

<u>1998 DSÖ/UÜPD Sınıflaması</u>	<u>Preneoplastik olmayan papiller intraepitelyal lezyonların sınıflandırması, AIC önerisi [20]</u>
Normal	
Hiperplazi	
Flat hiperplazi (papiller hiperplazi)	Epitelyal anormallikler
Flat lezyon, atipili	Reaktif ürotelyal atipi
Reaktif (inflamatuvar atipi)	Flat ürotelyal hiperplazi
Önemi belirsiz atipi	Preneoplastik varsayılan lezyon ve durumlar
Displazi (düşük dereceli intraepitelyal neoplazi)	Metaplazi
Karsinoma in situ (yüksek dereceli intraepitelyal neoplazi)	Keratinize skuamöz metaplazi
	Glandüler metaplazi
	Malignite ilişkili hücresel değişiklikler
	Preneoplastik lezyon
	Ürotelyal displazi
	Neoplastik noninvaziv lezyon
	Karsinoma in situ

2004 DSÖ sınıflandırmasında ürotelyal hiperplazi büyüme paterni temelinde 2 temel tanı kategorisi (flat ve papiller) altında incelenmektedir [21].

Flat ürotelyal hiperplazi: Sitolojik atipi içermeyen kalınlaşmış mukoza (>7 sıra) olarak tanımlanmıştır. Düşük dereceli papiller ürotelyal lezyonlarla ilişkili flat mukoza şeklinde görülebilmektedir (Resim 1B) [21, 23, 24].

Papiller ürotelyal hiperplazi: Nükleer atipi içermeyen çeşitli kalınlıkta ondülasyon gösteren ürotelyum ile karakterize lezyon şeklinde tanımlanmıştır. Lezyon bazalinde sıklıkla bir ya da az sayıda küçük dilate kapillerler bulunmaktadır (Resim 1A) [21, 23, 24].



Resim 1. A) Papiller ürotelyal hiperplazi, H&E, x40. **B)** Flat ürotelyal hiperplazi, H&E, x200.

Her iki lezyonun da tek başına görülmesi durumunda premalign potansiyele sahip olduğuna dair kanıt bulunamamıştır [24]. Ancak yapılan genetik çalışmalarda papiller ürotelyal neoplaziler ile benzer genetik mutasyona sahip oldukları gösterilmiştir [3, 6, 25]. Bu nedenle DSÖ 2016 sınıflamasında bu lezyonlar ‘malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon’ olarak isimlendirilmiştir (Tablo 1) [5].

2.3.2. Klinik ve Lokalizasyon

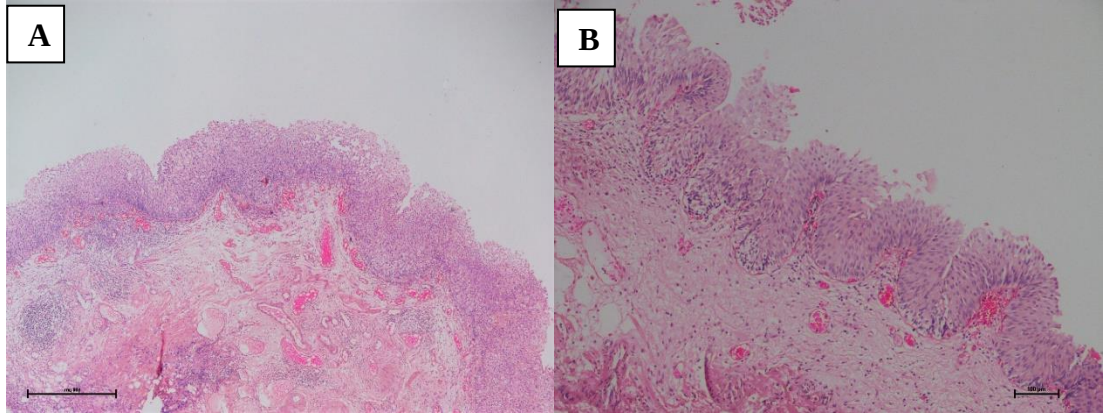
MPBÜP en sık olarak papiller ürotelyal neoplazm öyküsü olan hastalarda ve daha az sıklıkla mikrohematüri veya üriner obstrüktif semptomları olan hastalarda rutin sistoskopi takiplerinde bulunmaktadır [2]. Mesanede bildirilen spesifik bir lokalizasyonu yoktur [5].

2.3.3. Makroskopi

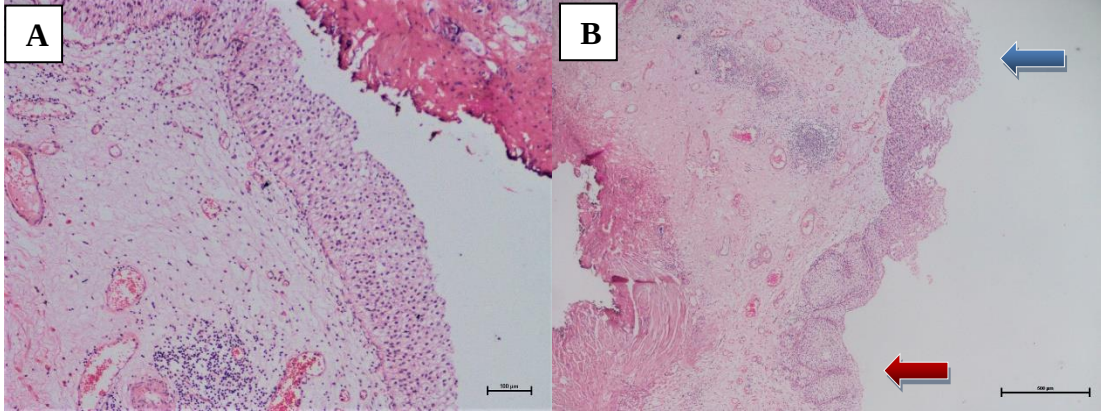
Bu lezyon tipik olarak fokal ve elevedir. Sistoskopik muayenede papiller, kabarık, sesil veya düzensiz şeklinde görülmektedir [2]. Flat lezyonlarda genel olarak gözle görülür bir anormallik bulunmaz [5].

2.3.4. Histopatoloji

Değişken yüksekliğe sahip dar dalgalı mukozal kıvrımlar halinde düzenlenen kalınlaşmış ürotelyum ile karakterizedir. Mukozal kıvrımlar ayrıca çadır şeklinde veya daha geniş olabilir (Resim 2A). Papiller neoplazmaların aksine, bu lezyonlar fibrovasküler kora sahip iyi oluşmuş papiller yapılardan yoksundur. Ancak lezyonun bazalinde stromada dilate damarlar görülebilir (Resim 2B) [10]. Sitolojik atipi minimaldir. Normal nükleus sitoplazma oranına sahiptir [4, 5]. Tamamen flat lezyonlarda ürotelyum belirgin şekilde kalınlaşır (sıklıkla ≥ 10 tabaka) ve / veya sadece minimal sitolojik atipi ile hücre yoğunluğu artar (Resim 3A). Bu lezyonlar izole görülebilir veya düşük dereceli papiller ürotelyal neoplazmlara bitişik olarak görülebilir (Resim 3B). İzole görülenler lezyonlarda, hastanın sıklıkla öncesinde papiller ürotelyal karsinom hikayesi mevcuttur [5].



Resim 2. A) Geniş ondülasyon gösteren kalınlaşmış ürotelyum, H&E, x40. **B)** Dar ondülasyon gösteren kalınlaşmış ürotelyum ve lamina propriada dilate konjesyone kapiller yapılar, H&E, x100.



Resim 3. A) Flat lezyon, H&E, x100. **B)** MPBÜP (kırmızı ok) komşuluğunda düşük dereceli papiller neoplazm (mavi ok), H&E, x40

2.3.5. Genetik

Kromozom 9 delesyonu, eşlik eden düşük dereceli papiller tümörü olan vakalarda sık (%37-70'sinde) görülmektedir [5]. Kromozom 9q delesyonunun en sık [3, 6, 7] ve bunu takiben 9p ve 18q delesyonun görüldüğünü bildiren çalışmalar mevcuttur [3]. Ayrıca FGFR3 mutasyonları ve FGFR3 amplifikasyonu, lezyonların küçük bir kısmında mevcuttur [5].

2.3.6. İmmünohistokimya

Normal ürotelyum gibi yüzeyel CK20 boyanması ve bazal CD44 boyanması görülmektedir [26].

2.3.7. Prognostik Faktörler

MPBÜP *de novo* ya da öncesinde ürotelyal neoplazm olanların takip sistoskopisinde saptanmaktadır. %79 vakada önceki lezyonu düşük dereceli ürotelyal neoplazmlar oluşturmaktadır [2]. Tanı konulduktan sonra 5 yıllık ürotelyal neoplazi gelişme riski, öncesinde papiller neoplazisi olan ve olmayan hastalar için sırasıyla %47,8 ve %27,4 olarak saptanmıştır [2]. Geçmişinde papiller neoplazi olan hastalarda görülmesi durumunda artmış rekürrens ile ilişkili olabilmektedir [21]. Sitolojik atipisi belirgin olan olgularda sonrasında daha yüksek dereceli papiller ürotelyal neoplazinin gelişimi ile ilgili bağlantı olduğu gösterilmiştir [27]. *de novo* görülen lezyonların klinik önemi hala bilinmemektedir [1].

2.4. SİTOKERATİN 20

Sitokeratinler, epitel hücrelerinde hücre iskeletinde var olan yapısal proteinlerdir [28]. Sitokeratin 20 (CK20) 1992'de ilk kez tanımlanmış bir tip I asidik düşük moleküler ağırlıklı sitokeratindir [29, 30].

CK20 normal ürotelyumda umbrella hücrelerinde nadiren intermediate hücrelerde eksprese olur. Displastik ürotelyumda CK20 ekspresyonu kayıptan ziyade disregüle olur. Sonuç olarak CK20 anormal ürotelyal hücre fenotipi için pozitif bir belirteçtir [8]. CK20 disregülasyonu (ürotelyumda tam kat boyanma veya tam kaybı) Ta/T1 mesane kanserlerinde rekürrens ile ilişkili bulunmuştur [31].

Mumtaz ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada borderline histolojik özelliklere sahip vakalarda, ürotelyal malignitelerin histolojik derecelendirilmesinde p53 ve CK20 birlikte yardımcı bir araç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [32]. Özellikle atipi durumunda CK 20'nin, karsinoma in situ'yu reaktif atipi, hiperplazi veya displaziden ayırmada yararlı olduğu gösterilmiştir [33].

2.5. Ki67 ANTİKOR

Ki67 proteini ilk olarak 1983 yılında Gerdes ve ark. tarafından prototip monoklonal antikor Ki67 olarak tanımlanmıştır [34]. Ki67 G0 fazındaki hücreler hariç hücre siklusunun G1, S, G2, M fazında mevcut olan nükleer bir proteindir [9, 35]. Yarılanma ömrü 1-1.5 saat kadardır [36, 37].

Ki67 normal ürotelyum, ürotelyal hiperplazi ve önemi belirsiz atipide sıklıkla bazalde ve genellikle epitel orta katmanlarının alt kısmında eksprese olur. Karsinoma in situ da tam kat boyanma gösterir [8].

Ki67'nin aşırı ekspresyonu ile agresif davranış arasındaki ilişki, çeşitli neoplazmlarda tarif edilmiş olup bu konuda en çok çalışılan örnekler prostat ve meme kanserleridir [36]. Mesane kanserlerinde tümör derecesi ve evresi agresif davranış göstergesi olarak kabul edilmekle birlikte birçok çalışmada Ki67 ekspresyonu iyi bilinen prognostik faktörler arasında tanımlanmıştır [38]. Ayrıca mesane karsinomlarında hücre proliferasyonu ile tümör grade, evre, rekürrens ve prognozu arasındaki ilişki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [9, 39].

2.6. P53 PROTEİN

P53 ilk keşfedildiğinde, bir viral onkogen için bir protein hedefi olarak tanımlanmıştır [40, 41]. Daha sonra intrinsik dönüşüm aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir [42]. P53, genomik stabilitenin korunmasında, genotoksik strese yanıtta ve hücre döngüsü apoptozisinin aktivasyonunda rol oynayan anahtar bir tümör baskılayıcı gendir [43, 44].

P53 tümör süpressör geni kanserlerde en sık mutasyona uğrayan gendir [44]. İmmünohistokimyasal boyama ile saptanabilen P53 genindeki mutasyonların, çeşitli tümörlerde sıklıkla gözlemlendiği ve birçok farklı kanserde prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir [35]. P53 gen mutasyonu ve immünohistokimyasal olarak pozitiflik ürotelyal karsinomların %40-60'ında bulunmuştur [9]. Normal ürotelyumda fokal, çok zayıf immünreaktivite görülmekte ya da hiç görülmemektedir. Ürotelyal displazi ve karsinoma in situ'da p53 tüm hücrelerin çoğunda (>%50) overekspresyon göstermektedir. P53 overekspresyonu mesane tümörogenezinde progresyonu göstermektedir [8]. Ayrıca nüks, tümör ilerlemesi ve metastazsız aralık gibi prognostik parametrelerle ilişkilendirilmiştir [39].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. VAKA GRUBUNUN TANIMLANMASI

Çalışmaya T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Patoloji Kliniğinde 2007-2016 yılları arasında yapılan 91 adet mesane transüretal rezeksiyon(TUR)/biyopsi materyali dahil edilmiştir. Vakalar Alp Data-Bilfo ve Çözüm hastane bilgi yönetim sisteminden (HBYS) taranmıştır. Ürotelyumunda herhangi bir patoloji bulunmayan (sistit vb.) olgular haricindeki non-invaziv ürotelyal lezyonlar, ürotelyal/epitelyal hiperplazi, reaktif atipi, önemi belirsiz atipi, infiltratif ürotelyal karsinomlar ve spesifik tanı verilmeyen tüm mesane TUR/biyopsi materyalleri yeniden incelenerek arasından MPBÜP saptanan olgular çalışmaya dahil edilmiş, MPBÜP saptanmayan olgular çalışmanın dışında tutulmuştur.

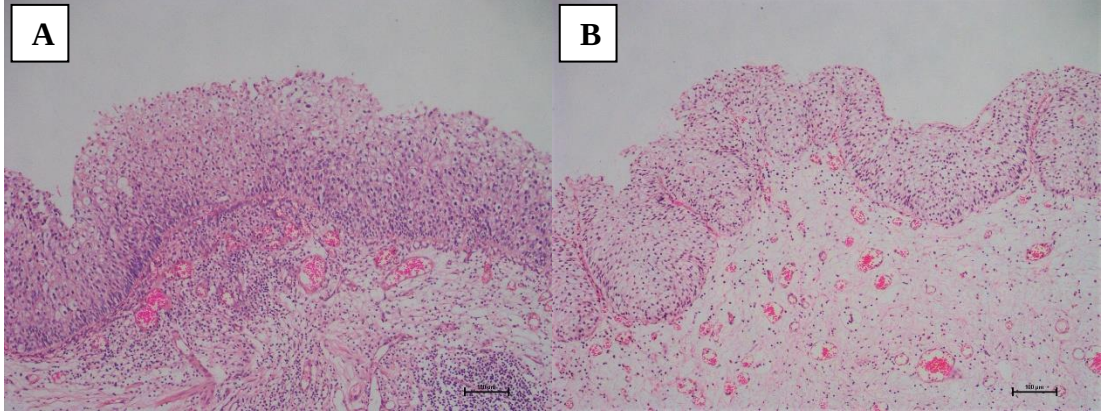
3.2. HİSTOMORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

%10'luk tamponlu formalin solüsyonu ile fiksasyonu sonrası standart örnekleme ve rutin takip protokolleri ile hazırlanmış Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı arşiv preparatları ışık mikroskobu ile yeniden incelenmiştir. İnceleme biri uzman biri asistan, iki gözlemci tarafından yapılmış olup inceleme yapılırken *Olympus CX31* ve *Nicon Eclipse* olmak üzere iki ışık mikroskobu kullanılmıştır.

Olgular değerlendirilirken raporlandıkları tarihteki mevcut tanılarına bakılmaksızın, MPBÜP kriterlerini taşıyan lezyonun bulunduğu olguların tümü çalışmaya dahil edilmiştir.

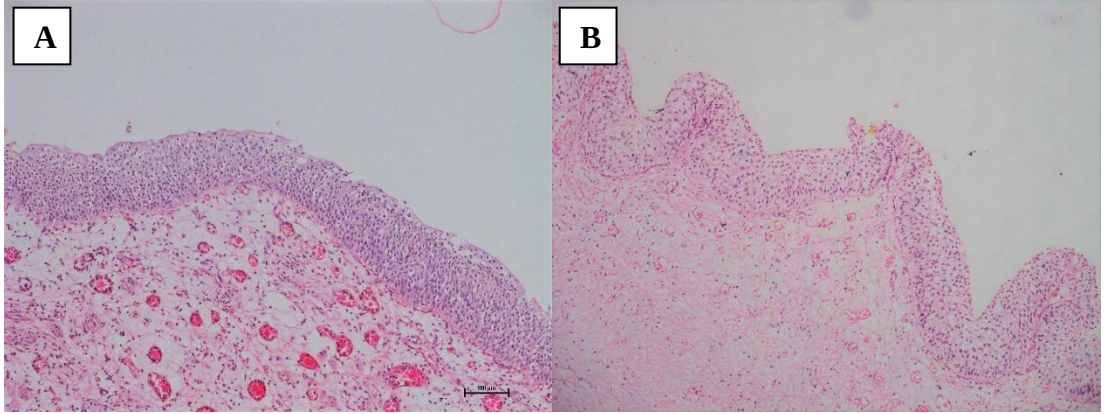
Bu olgular öncelikle inflamasyon ve ondülasyon varlığı var/yok şeklinde değerlendirilerek kaydedildi.

İnflamasyon: Lezyon altındaki lamina propriadaki lenfosit yoğunluğuna bakılarak değerlendirildi. Bir odakta agregat yapan lenfosit varlığı veya epiteli atake eden/etmeyen dağınık halde yoğun lenfosit varlığı inflamasyon var olarak, bunu dışındakiler yok olarak değerlendirildi (Resim 4). Ayrıca geniş tabanlı papiller yapıların olmaması ve lamina propriada ödem, granülasyon dokusunun olmamasına dikkat edilerek papiller/polipoid sistit tanısı ekarte edildi.



Resim 4. A) İnflamasyon var, H&E, x100. **B)** İnflamasyon yok, H&E, x100.

Ondülasyon: Gerçek bir fibrovasküler koru olmayan epiteldeki papilla benzeri oluşumlar ondülasyon var olarak, bunun dışındakiler yok olarak değerlendirildi (Resim 5).



Resim 5. A) Flat /ondülasyon yok, H&E, x100. **B)** Ondülasyon var, H&E, x100.

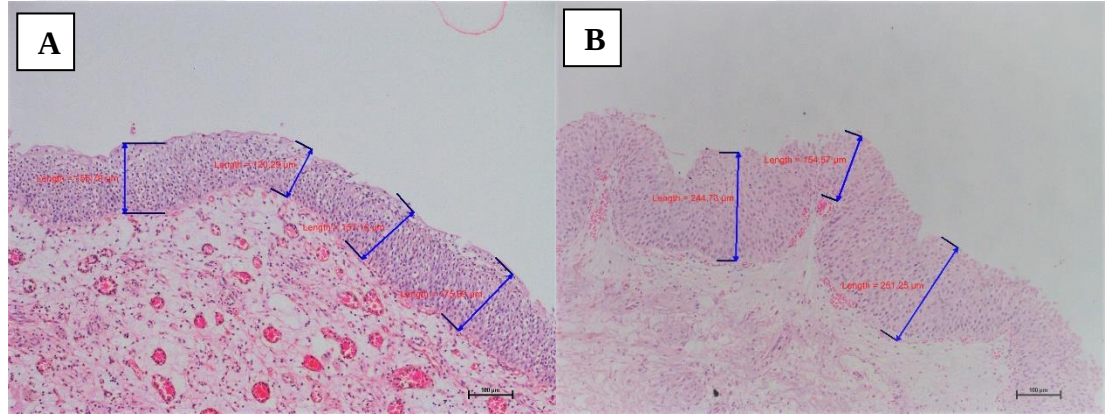
Olgulara ait mevcut biyopsi tanılarına ek olarak HBYS'den (Alp Data-Bilfo ve Çözüm) diğer TUR/biyopsi sonuçları araştırıldı. En az 6 ay klinik takibi (2 biyopsi ve/veya labaratuvar tetkiki) olan olgular takipli olarak kabul edildi ve MPBÜP bulunduğu tarihten öncesinde ve/veya sonrasında neoplazi ve/veya malignite olanlar ayrıca kaydedildi. Mevcut tanımlar değerlendirilirken (MPBÜP'un saptandığı) ilk tanıdan 2. ayın sonuna kadar tespit edilen tümörler (rezidü) eş zamanlı, daha sonra saptananlar “nüks” olarak kabul edildi ve bu kriterlere göre öncesi ve sonrasındaki

neoplaziler kaydedildi. Olgulara ait biyopsi tanılarında o tarihte geçerli olan 2004 DSÖ klasifikasyonu baz alınmıştır.

3.3. MORFOMETRİK DEĞERLENDİRME

MPBÜP saptanan olgularda morfometrik değerlendirme *Nicon Eclipse* ışık mikroskobu ve '*NIS elements D on Nicon DS-U3 session*' sistemde yapılmıştır. Olgulara morfometrik analiz olarak ürotelyum kalınlığı ölçüldü, her bir olgu için ortalama nükleus çapı hesaplandı ve kaydedildi.

Ürotelyum kalınlığı ölçümü: Lezyonu oluşturan ürotelyumun en kalın olduğu yerler seçilerek farklı ölçümler yapıldı ve en kalın ölçüm sonucu kaydedildi (Resim 6).



Resim 6. Flat (A) ve ondülan (B) lezyonda ürotelyum kalınlığı ölçümü, H&E, x100.

Ortalama nükleus çapı ölçümü: Lezyonun içerisinde rastgele x400 büyütmede en az 10 farklı nükleus (şemsiye hücreleri hariç) çapı en geniş yerlerinden ölçüldü ve bunların ortalaması alınarak kaydedildi (Resim 7) [45].

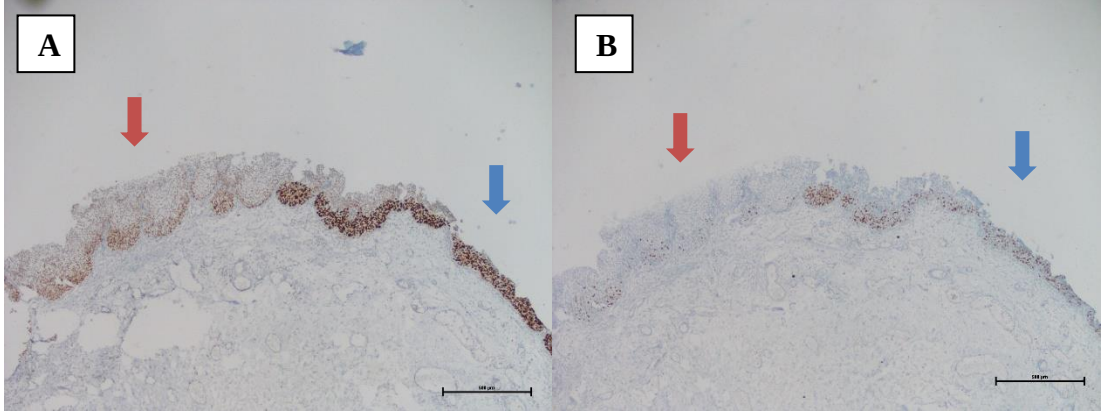
Tablo 3. Kullanılan antikorların özellikleri

	CK20	P53	Ki67
Antikor	<i>FLEX</i>	<i>FLEX</i>	<i>FLEX</i>
özellikleri	<i>Monoclonal Mouse</i>	<i>Monoclonal Mouse</i>	<i>Monoclonal Mouse</i>
	<i>Anti-Human</i>	<i>Anti-Human</i>	<i>Anti-Human</i>
	<i>Cytokeratin 20</i>	<i>P53 Protein</i>	<i>Ki67 Antigen</i>
	<i>Clone Ks 20.8</i>	<i>Clone DO-7</i>	<i>Clone MIB-1</i>
	<i>Ready-to-Use</i>	<i>Ready-to-Use</i>	<i>Ready-to-Use</i>
	<i>(Link)</i>	<i>(Link)</i>	<i>(Link)</i>
	<i>DAKO Denmark</i>	<i>DAKO Denmark</i>	<i>DAKO Denmark</i>
	<i>Code IR777</i>	<i>Code IR616</i>	<i>Code IR626</i>

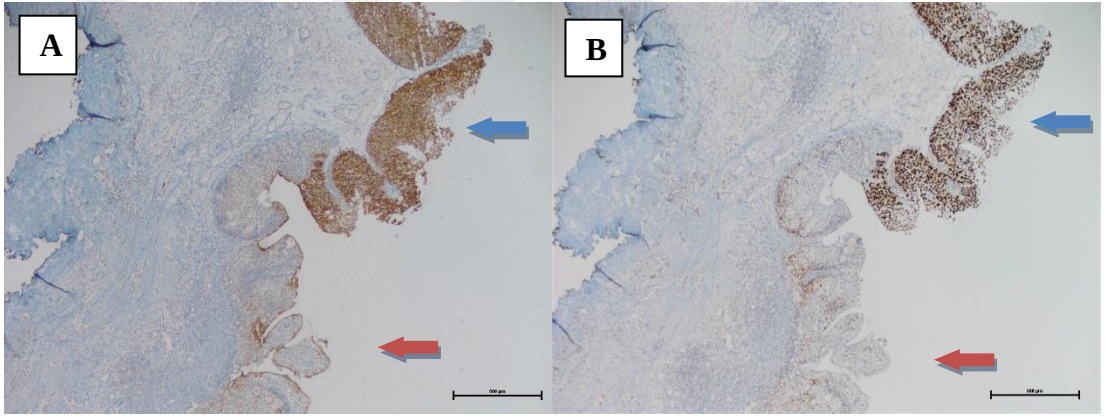
3.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

İnceleme biri uzman biri asistan, iki gözlemci tarafından yapılmış olup inceleme yapılırken Olympus CX31 ve Nikon Eclipse olmak üzere iki ışık mikroskobu kullanılmıştır.

İmmünohistokimyasal değerlendirme MPBÜP alanlarının tamamında yapılmıştır. CK20 için sitoplazmik, Ki67 ve P53 için nükleer kuvvetli boyanma epitel içerisindeki yaygınlıkları değerlendirilerek epiteldeki boyanma lokalizasyonlarına göre kaydedilmiştir. Pozitif kontrol olarak; CK20 antikoru için kolon mukozası, Ki67 antikoru için tonsil dokusu, P53 protein için kolon adenokarsinomu kullanılmıştır. Ayrıca değerlendirme yapılırken mevcut dokulardaki iç kontroller de göz önünde bulundurulmuştur (Resim 8 ve 9).

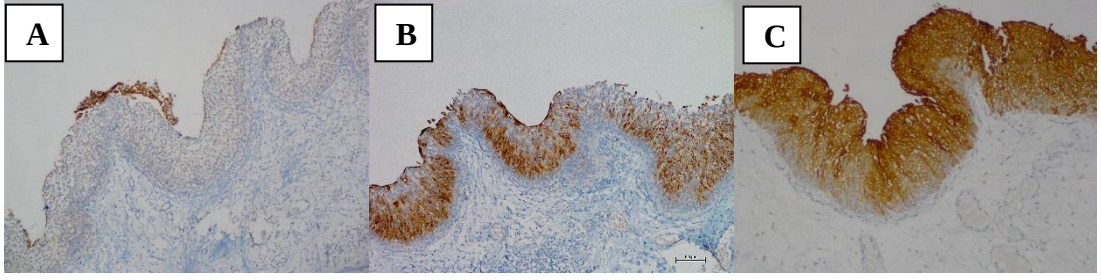


Resim 8. Karsinoma in situ komşuluğunda (mavi ok) MPBÜP (kırmızı ok); **A)** P53 immünreaksiyonu, x40. **B)** Ki67 immünreaksiyonu, x40.



Resim 9. Düşük dereceli papiller neoplazi komşuluğunda (mavi ok) MPBÜP (kırmızı ok) **A)** CK20 immünreaksiyonu, x40. **B)** P53 immünreaksiyonu, x40.

CK20 normal boyanma paterni süperfisyal (şemsiye) hücrelerde pozitif ve intermedier ve bazal hücrelerde negatiftir [46]. Bizim vakalarımızda CK20; yüzeyel boyanma, hücrelerin epitel ortasına kadar boyanması ve tam kat boyanması şeklinde (epitel içindeki yaygınlıkları) değerlendirilmiştir (Resim 10). CK20'nin yüzeyel boyanması normal boyanma paterni bunun haricindeki boyanması anormal boyanma paterni olarak kabul edilmiştir (Tablo 4).

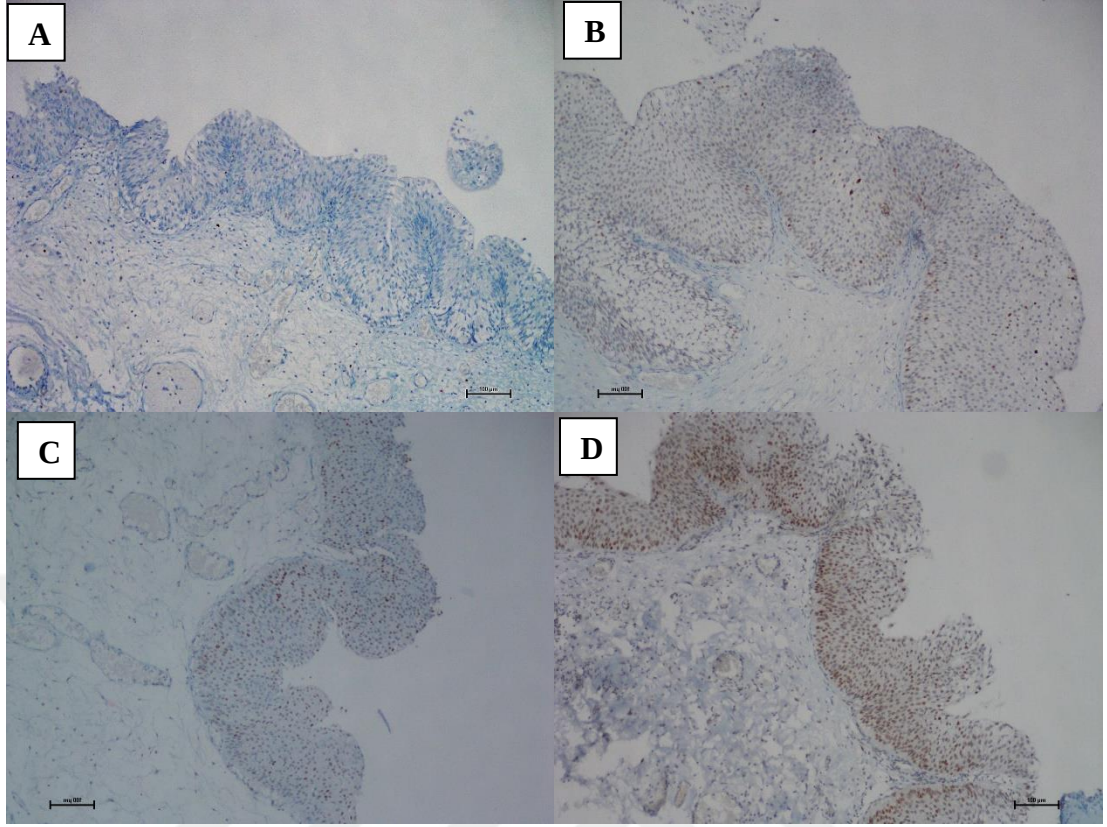


Resim 10. CK20 ile yüzeyel (A), epitel ortasına kadar (B) ve tam kat (C) boyanma, x100.

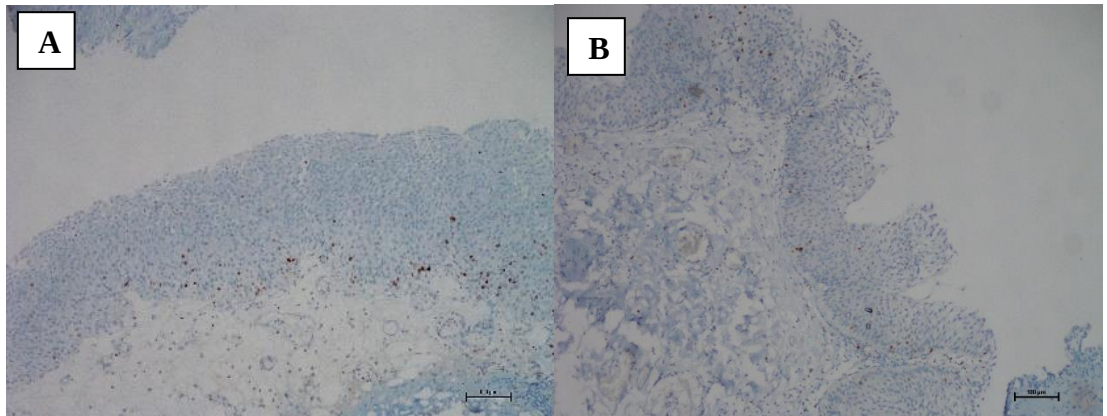
Tablo 4. CK20 boyanma paterninin değerlendirilmesi

CK20	Normal boyanma paterni	Anormal boyanma paterni
Yüzeyel boyanma	X	
Epitel ortasına kadar boyanma		X
Tam kat boyanma		X

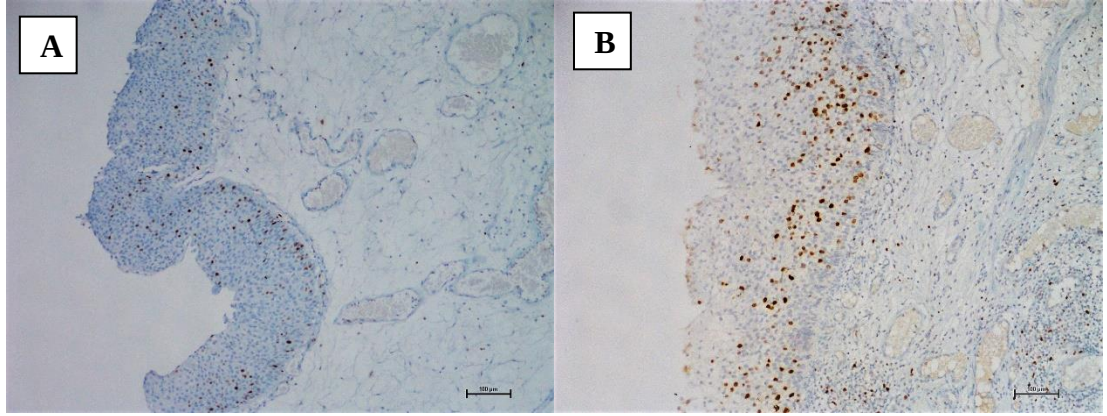
MPBÜP alanının tamamı incelenmiş ve Ki67 ve P53; bazalde az sayıda (yaklaşık <%5) hücrede nükleer boyanma, bazalde 1-2 sıra hücrede (yaklaşık %5-10) nükleer boyanma ve bazalde 2 sıradan fazla (yaklaşık %10'dan fazla) hücrede nükleer boyanma olarak değerlendirilmiştir. Buna ek olarak P53 için hiç boyanma olmaması da ayrıca kaydedilmiştir (Resim 11-13).



Resim 11. P53 ile hiç boyanma olmaması (A); az sayıda hücrede (B), 1-2 sıra hücrede (C) ve 2 sıradan fazla hücrede (D) boyanma, x100.



Resim 12. Flat (A) ve ondulan (B) lezyonda Ki67 ile bazal az sayıda hücrede boyanma, x100.



Resim 13. Ki67 ile 1-2 sıra hücrede **(A)** ve 2 sıradan fazla hücrede **(B)** boyanma x100.

P53 ile hiç boyanma olmaması, bazal az sayıda hücrede boyanma ve bazal 1-2 sıra hücrede nükleer boyanma (%10 a kadar) negatif, bazal 2 sıradan fazla (%10'dan fazla) hücrede nükleer boyanma pozitif olarak kabul edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. P53 boyanma paternin değerlendirilmesi

P53	Negatif	Pozitif
Hiç boyanma yok	x	
Bazal az sayıda hücre boyanması	x	
Bazal 1-2 sıra hücre boyanması	x	
Bazal > 2 sıra hücre boyanması		x

Ki67 için ise; bazal az sayıda hücrede boyanma ve bazal 1-2 sıra hücrede nükleer boyanma (%10 a kadar) düşük proliferasyon, bazal 2 sıradan fazla (%10'dan fazla) hücrede nükleer boyanma yüksek proliferasyon olarak kabul edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Ki67 boyanma paternin değerlendirilmesi

Ki67	Düşük proliferasyon	Yüksek proliferasyon
Bazal az sayıda hücre boyanması	x	
Bazal 1-2 sıra hücre boyanması	x	
Bazal > 2 sıra hücre boyanması		x

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapılmıştır. Sürekli sayısal değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov testiyle varyansların homojenliği varsayımının sağlanıp sağlanmadığı ise Levene testiyle değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler; sürekli sayısal değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (minimum - maksimum) biçiminde gösterilirken kategorik değişkenler olgu sayısı ve (%) olarak ifade edildi. Gruplar arasında parametrik test istatistiği varsayımlarının sağlandığı sürekli sayısal değişkenler yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Student's t testi ile ikiden fazla bağımsız grup arasındaki farkın önemliliği ise tek yönlü varyans analizi ile incelendi. Kategorik değişkenler Süreklilik düzeltmeli Ki-Kare ya da Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arasında sıralanabilir değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı ise Mann Whitney U testiyle incelendi. MPBÜP saptanan olgularda neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı ölçümlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliğinin olup olmadığı ise ROC eğrisi altında kalan alan ve %95 güven aralıkları hesaplanarak değerlendirildi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.7. ETİK KURUL ONAYI

Çalışmanın yürütülebilmesi amacıyla T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 07.01.2019 tarihinde 58/07 nolu etik kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

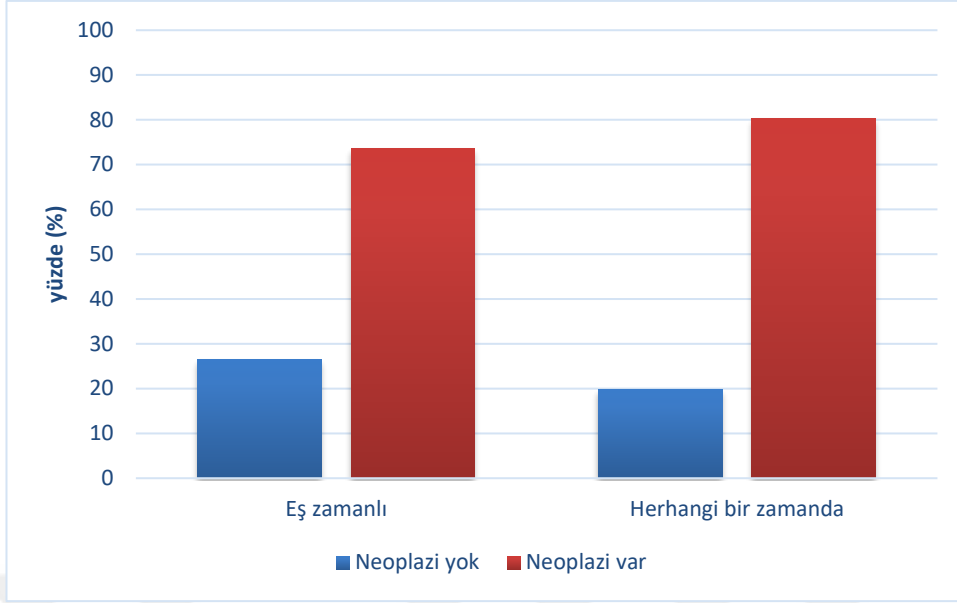
4.1. KLİNİK BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 91 olgunun 79'u (%86,8) erkek, 12'si (%13,2) kadındır (E:K=6,5:1). Tanı anındaki olguların yaş ortalaması 66,7 (yaş aralığı, 39–88)'dir (Tablo 7).

91 olgunun 73'ünde (%80,2) herhangi bir zamanda (öncesinde/sonrasında/eş zamanlı) neoplazi ile ilişki saptanmıştır. Olguların 18'inde (%19,8) ise neoplazi ile ilişki saptanmamıştır (Tablo 7 ve Grafik 1).

Tablo 7. Olguların demografik ve klinik özellikleri

	n=91
Yaş (yıl)	66,7±10,7
Yaş aralığı (yıl)	39 - 88
Cinsiyet	
Erkek	79 (%86,8)
Kadın	12 (%13,2)
Herhangi bir zamanda neoplazi ile ilişki	
Yok	18 (%19,8)
Var	73 (%80,2)



Grafik 1. MPBÜP'un eş zamanlı ve herhangi bir zamanda neoplazi ile birlikteliği

Olguların 67'sinde (%73,6) MPBÜP ile eşzamanlı (53'ü aynı biyopsi örneğinde farklı alan/uzak komşuluğunda ve 14'ü re-biyopsi materyalinde) neoplazi mevcuttu. 24'ünde (%26,4) ise neoplazi izlenmedi (Grafik 1). Neoplazi ile birlikte olan olguların 27'si (%40,3) NİPÜK,D, 27'si (%40,3) İÜK,Y, 6'sı (%8,9) DMPÜN, 4'ü (%6,0) İÜK,D, 2'si (%3,0) NİPÜK,Y, 1'i (%1,5) ÜD vakalarından oluşmaktadır (Tablo 8).

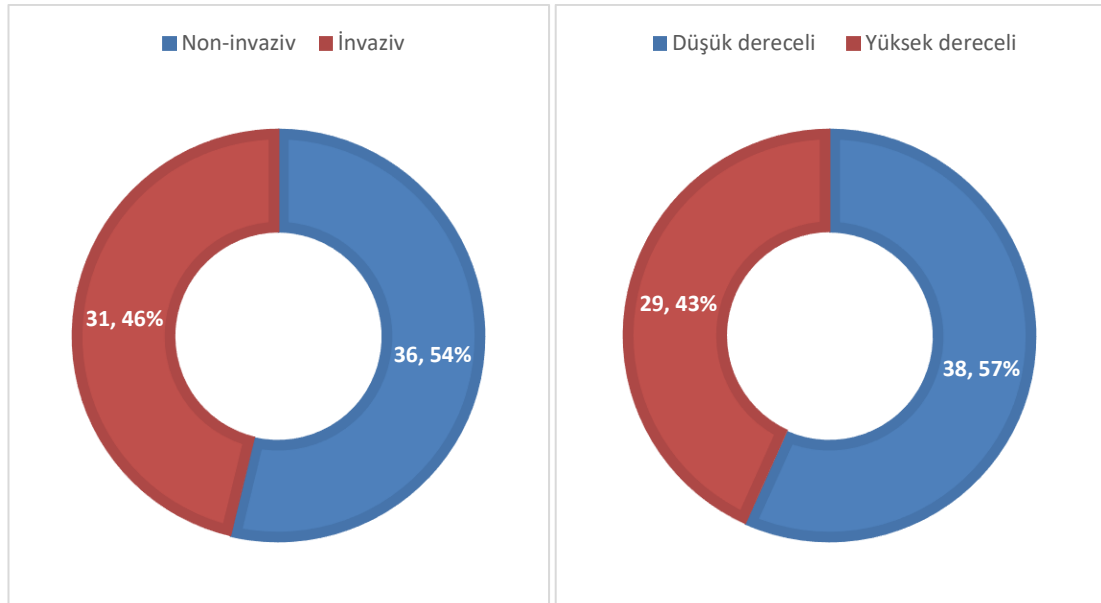
Tablo 8. MPBÜP ile eş zamanlı ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki

Eş zamanlı neoplaziler	n	%
İÜK, D	4	6,0
İÜK, Y	27	40,3
NİPÜK, D	27	40,3
NİPÜK, Y	2	3,0
DMPÜN	6	8,9
ÜD	1	1,5
Toplam	67	100,0

MPBÜP ile eş zamanlı neoplazi mevcut olan 67 olgunun 38'i (%56,7) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 29'u (%43,3) yüksek dereceli ürotelyal neoplazi olup; 36'sı (53,7) noninvaziv, 31'i (%46,3) invazivdir (Tablo 9 ve Grafik 2).

Tablo 9. Neoplazi ile birlikte olan olguların tümör derecesi ve invazyon özellikleri açısından dağılımları

	n	%
Tümör derecesi		
Düşük	38	56,7
Yüksek	29	43,3
İnvazyon		
Non-invaziv	36	53,7
İnvaziv	31	46,3
Toplam	67	100,0



Grafik 2. Neoplazi ile birlikte olan olguların tümör derecesi ve invazyon özellikleri açısından dağılımları

MPBÜP saptanan olguların 23'ünde öncesinde neoplazi mevcuttu. Bunların 20 'si (%86,9) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 3'ü (%13,1) yüksek dereceli ürotelyal neoplazi vakalarından oluşmaktaydı (Tablo 10).

Tablo 10. MPBÜP ile öncesi ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki

Önceki neoplaziler	n	%
İÜK, D	4	17,4
İÜK, Y	3	13,1
NİPÜK, D	14	60,9
DMPÜN	1	4,3
ÜD	1	4,3
Toplam	23	100

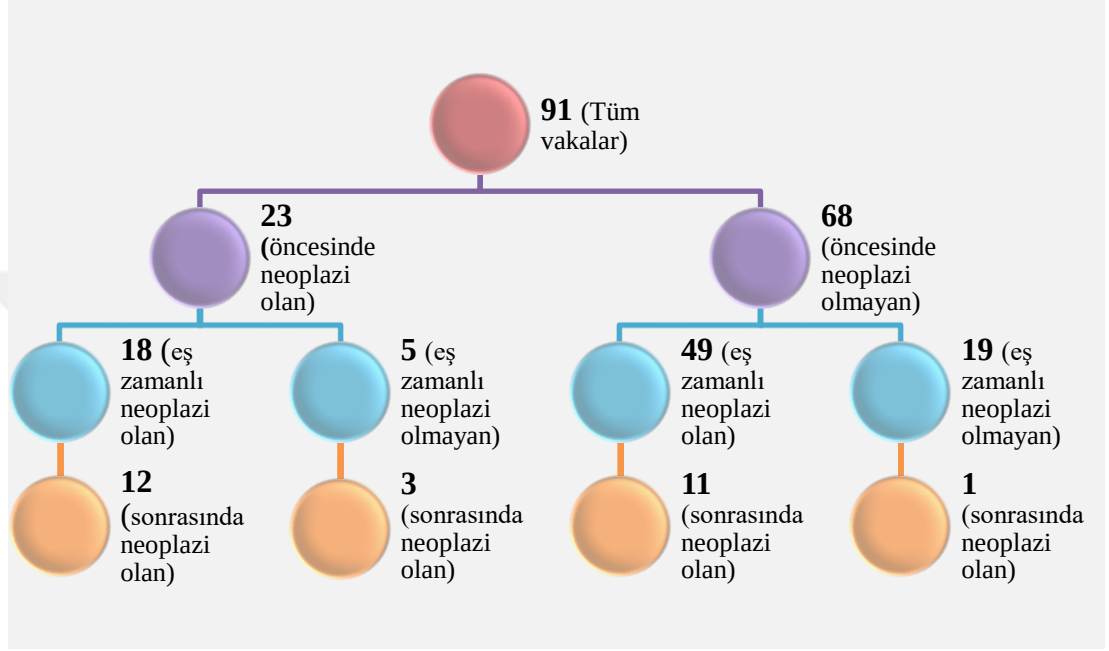
59 olgunun en az 6 ay takibi mevcuttur. Olguların 27'sinde sonrasında neoplazi ile ilişki saptanmıştır. Bunların 17 'si (%63) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 10'u (%37) yüksek dereceli ürotelyal neoplaziden oluşmaktaydı (Tablo 11).

Tablo 11. MPBÜP ile sonrası ürotelyal neoplaziler arasındaki ilişki

Sonraki neoplaziler	n	%
İÜK, D	2	7,5
İÜK, Y	9	33,3
NİPÜK, D	15	55,5
NİPÜK, Y	1	3,7
Toplam	27	100

Öncesinde neoplazisi olan 23 olgunun 15'inde MPBÜP tanısı sonrasında da neoplazi saptanmıştır. Ayrıca bu 15 olgunun 12'sinde eş zamanlı neoplazi de mevcuttu. Kalan 3 vakada ise öncesinde ve sonrasında NİPÜK, D saptanmıştır (Şekil 3).

Öncesinde neoplazi saptanmayan 68 olgunun 12' sinde MPBÜP tanısı sonrasında neoplazi saptanmıştır. Ayrıca bu 12 vakanın 11'inde eş zamanlı neoplazi de mevcuttu (Şekil 3). Kalan bir vakada ise sadece sonrasında NİPÜK,D saptanmıştır. Bu olguda MPBÜP tanısından tümör gelişimine kadar geçen süre 33 aydır.



Şekil 3. Olguların neoplazi ile birliktelikleri (eş zamanlı/öncesi/sonrası)

Eş zamanlı İÜK,D tanısı olan üç vakada sonrasında İÜK,Y; eşzamanlı NİPÜK,D tanısı olan bir vakada sonrasında İÜK,D ve eş zamanlı ÜD tanısı olan bir vakada sonrasında İÜK,Y saptanmıştır. Öncesinde ve eş zamanlı NİPÜK,D tanısı olan bir vakada sonrasında İÜK,Y ve öncesinde displazi, eş zamanlı DMPÜN tanısı olan bir vakada sonrasında NİPÜK,D saptanmıştır.

4.2. MORFOLOJİK BULGULAR

91 olgunun 82'sinde (%90,1) ondülasyon mevcut olup 9'unda (%9,9) ondülasyon gözlenmedi. 51'inde (%56,0) inflamasyon izlenmiş olup 40'ında (%44,0) inflamasyon izlenmedi (Tablo 13).

MPBÜP alanlarında ürotelyum kalınlığı 98,92 μm ile 328,54 μm arasında değişmekte olup ortalama ürotelyum kalınlığı 192,03($\pm$ 47,27)'tür. Nükleus çapı 5,5 μm ile 10,37 μm arasında değişmektedir. Ortalama nükleus çapı 7,73($\pm$ 0,98)'tür (Tablo 12).

Tablo 12. Morfolojik bulgular

n=91	
Ondülasyon	
Yok	9 (%9,9)
Var	82 (%90,1)
İnflamasyon	
Yok	40 (%44,0)
Var	51 (%56,0)
Ürotelyum kalınlığı (μm)	192,03 $\pm$ 47,27
Nükleus çapı (μm)	7,73 $\pm$ 0,98

4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

91 olgunun 77'sine immünohistokimyasal boyama uygulanmış olup 14'ünün parafin bloğuna ulaşamadığı için immünohistokimyasal çalışma yapılamamıştır.

CK20 ile 64 (%83,1) vakada yüzeysel (şemsiye hücrelerinde), 5 (%6,5) vakada epitel ortasına kadar (yüzeysel+intermedier hücrelerde), 8 (%10,4) vakada tam kat (yüzeysel + intermedier + bazal) boyanma izlendi. CK20 64 (%83,1) vakada normal boyanma, 13 (%16,9) vakada anormal boyanma olarak değerlendirildi. (Tablo 13).

P53 ile 41 (%53,2) vakada bazalde az sayıda hücrede (yaklaşık <%5), 27 (%35,1) vakada 1-2 sıra hücrede (yaklaşık %5-10), 6 (%7,8) vakada 2 sıradan fazla hücrede (yaklaşık >%10) boyanma izlenirken 3 (%3,9) vakada hiç boyanma gözlenmedi. P53, 71 (%92,2) vakada negatif, 6 (%7,8) vakada pozitif olarak değerlendirildi (Tablo 13).

Ki67 ile 53 (%68,8) vakada bazalde az sayıda hücrede (yaklaşık <%5), 19 (%24,7) vakada 1-2 sıra hücrede (yaklaşık %5-10), 5 (%6,5) vakada 2 sıradan fazla hücrede (yaklaşık >%10) boyanma izlendi. Ki67, 72 (%93,5) vakada düşük proliferasyon, 5 (%6,5) vakada yüksek proliferasyon olarak değerlendirildi (Tablo 13).

Tablo 13. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları

	n=77
CK20	
Yüzeyel	64 (%83,1)
Epitel ortasına kadar	5 (%6,5)
Tam kat	8 (%10,4)
• Normal	64 (%83,1)
• Anormal	13 (%16,9)
P53	
Hiç boyanma yok	3 (%3,9)
Bazalde az sayıda	41 (%53,2)
1-2 sıra	27 (%35,1)
>2 sıra	6 (%7,8)
• Negatif	71 (%92,2)
• Pozitif	6 (%7,8)
Ki-67	
Bazalde az sayıda	53 (%68,8)
1-2 sıra	19 (%24,7)
>2 sıra	5 (%6,5)
• Düşük proliferasyon	72 (%93,5)
• Yüksek proliferasyon	5 (%6,5)

4.4. HERHANGİ BİR ZAMANDA VE/VEYA EŞ ZAMANLI NEOPLAZİ SAPTANAN VE SAPTANMAYAN OLGULARIN MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Vakalar; ondülasyon, inflamasyon, ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı olarak neoplazi ile ilişkisi ayrı ayrı değerlendirildi.

Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre ondülasyon yönünden olguların karşılaştırılması yapılacak olursa neoplazi saptanan 67 olgunun 61'inde (%91) ondülasyon izlendi. 6'sında (%9) izlenmedi. Neoplazi gözlenmeyen 24 olgunun 21'inde (%87,5) ondülasyon izlendi. 3'ünde (%12,5) izlenmedi (Tablo 14). Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ondülasyon varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,694$).

Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre inflamasyon yönünden olguların karşılaştırılması yapılacak olursa neoplazi saptanan 67 olgunun 30'unda (%44,8) inflamasyon izlendi. 37'sinde (%55,2) izlenmedi. Neoplazi gözlenmeyen 24 olgunun 21'inde (%87,5) inflamasyon izlendi. 3'ünde (%12,5) izlenmedi. Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede inflamasyon varlığının anlamlı bir etkisi olup ($p<0,001$) neoplazi gözlenmeyen grupta inflamasyon daha yüksek oranda görülmektedir (Tablo 14).

Tablo 14. Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre ondülasyon ve inflamasyon yönünden olguların karşılaştırılması

	Neoplazi yok (n=24)	Neoplazi var (n=67)	p-değeri
Ondülasyon			0,694†
Yok	3 (%12,5)	6 (%9,0)	
Var	21 (%87,5)	61 (%91,0)	
İnflamasyon			<0,001‡
Yok	3 (%12,5)	37 (%55,2)	
Var	21 (%87,5)	30 (%44,8)	

† Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi, ‡ Süreklilik düzeltmeli Ki-Kare testi.

Eş zamanlı neoplazi gözlenen grupta ortalama ürotelyum kalınlığı 192,8(±47,4) µm, ortalama nükleus çapı 7,7(±0,9) µm; neoplazi gözlenmeyen grupta ise ortalama ürotelyum kalınlığı 189,8(±47,7) µm, ortalama nükleus çapı 7,8(±1,2) µm'dir (Tablo 15). Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grup arasında sırasıyla; ortalama ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p=0,790 ve p=0,579).

Tablo 15. Eş zamanlı neoplazi gözlenen ve gözlenmeyen gruplara göre ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden olguların karşılaştırılması

	Neoplazi yok (n=24)	Neoplazi var (n=67)	p-değeri
Ürotelyum kalınlığı (µm)	189,8±47,7	192,8±47,4	0,790†
Nükleus çapı (µm)	7,8±1,2	7,7±0,9	0,579†

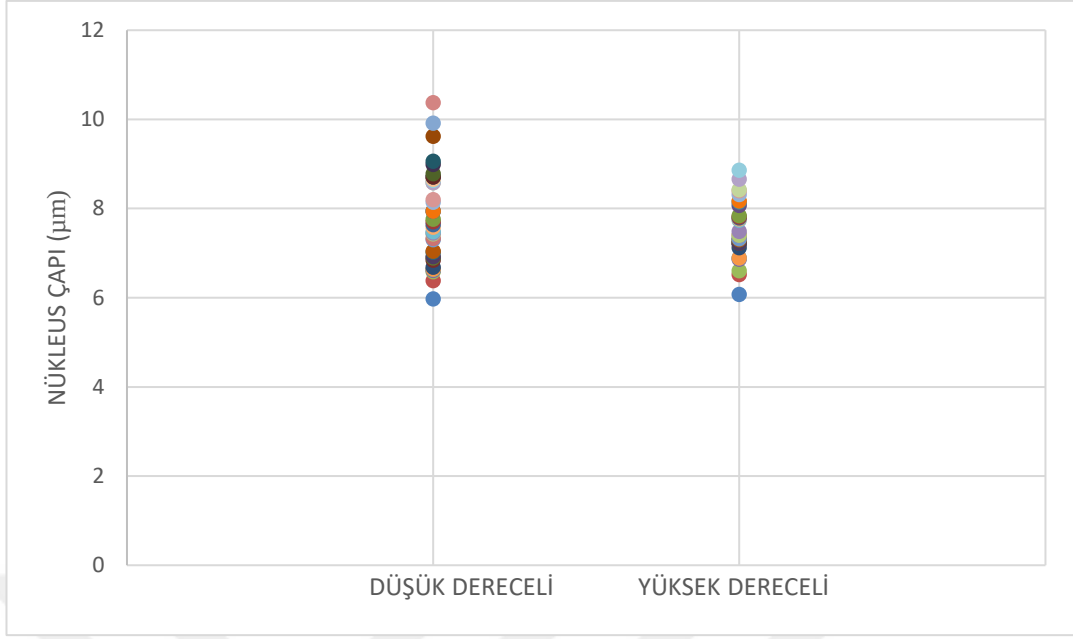
† Student's t testi

Neoplazi saptanmayan (24 vaka) vakalarda ortalama nükleus çapı 7,82(±1,19) µm'dir. Neoplazi saptanan vakalardan düşük dereceli (38 vaka) olanlarda ortalama nükleus çapı 7,81(±1,03) µm; yüksek dereceli (29 vaka) olanlarda ortalama nükleus çapı 7,54(±0,67) µm'dir (Grafik 3 ve Tablo 16). Tümör derecelerine göre nükleus çaplarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,475).

Tablo 16. Tümör derecelerine göre nükleus çaplarının karşılaştırılması

	n	Nükleus çapı (µm)
Benign	24	7,82±1,19
Düşük dereceli	38	7,81±1,03
Yüksek dereceli	29	7,54±0,67
p-değeri †		0,475

† Tek yönlü varyans analizi.



Grafik 3. Tümör derecelerine göre nükleus çaplarının dağılımı.

Herhangi bir zamanda neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grup arasında sırasıyla; ortalama ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,898$ ve $p=0,912$).

Herhangi bir zamanda neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ürotelyum kalınlığına ait ROC eğrisi altında kalan alan 0,504 (%95 Güven Aralığı: 0,356-0,651) olup söz konusu ölçümlerin istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi ($p=0,960$). Nükleus çapına ait ROC eğrisi altında kalan alan ise 0,509 (%95 Güven Aralığı: 0,343-0,674) olup söz konusu ölçümlerin istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi ($p=0,909$) (Tablo 17).

Tablo 17. Neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı ölçümleri ile söz konusu ölçümlere ait ROC eğrisi altında kalan alan ve %95 güven aralıkları

	Ürotelyum kalınlığı (µm)	Nükleus çapı (µm)
Eşlik eden neoplazi		
Yok (n=18)	193,32±45,58	7,75±1,25
Var (n=73)	191,72±47,98	7,72±0,91
p-değeri †	0,898	0,912
ROC analizi		
Eğri altında kalan alan	0,504	0,509
%95 Güven Aralığı	0,356-0,651	0,343-0,674
p-değeri ‡	0,960	0,909

† Student's t testi, ‡ ROC analizi.

4.5. EŞ ZAMANLI NEOPLAZİ SAPTANAN VE SAPTANMAYAN OLGULARIN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA PATERNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Eş zamanlı neoplazi saptanan vakalarda; CK20 ile 49 (%81,7) vakada normal boyanma, 11 (%18,3) vakada anormal boyanma; Ki67 ile 4 (%6,7) vakada yüksek proliferatif aktivite, 56 (%93,3) vakada düşük proliferatif aktivite izlendi. P53 3 (%5) vakada pozitif, 57 (%95) vakada negatif olarak değerlendirildi. Neoplazi saptanamayanlarda ise; CK20 ile 15 (%88,2) vakada normal boyanma, 2 (%11,8) vakada anormal boyanma; Ki67 ile 1 (%5,9) vakada yüksek proliferatif aktivite, 16 (%94,1) vakada düşük proliferatif aktivite izlendi. P53 3 (%17,6) vakada pozitif, 14 (%82,4) vakada negatif olarak değerlendirildi.

Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede sırasıyla CK20 boyanma paterni, P53 ekspresyonu ve Ki67 proliferatif aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (p=0,721, p=0,118 ve p>0,999) (Tablo 18).

Tablo 18. Eş zamanlı neoplazi saptanan ve saptanmayan olguların immünohistokimyasal boyanma paternlerinin karşılaştırılması

	Neoplazi yok (n=17)	Neoplazi var (n=60)	p-değeri
CK20			0,721¶
Normal	15 (%88,2)	49 (%81,7)	
Anormal	2 (%11,8)	11 (%18,3)	
P53			0,118¶
Negatif	14 (%82,4)	57 (%95)	
Pozitif	3 (%17,6)	3 (%5)	
Ki-67			>0,999¶
Düşük proliferasyon	16 (%94,1)	56 (%93,3)	
Yüksek proliferasyon	1 (%5,9)	4 (%6,7)	

¶ Fisher'in kesin sonuçlu olasılık testi

5. TARTIŞMA

Papiller hiperplazinin histolojik özelliklerinin iyi tanımlandığı Taylor ve ark.'nın 1996 yılında yaptığı çalışma insanlarda papiller hiperplazi'yi, papiller ürotelyal neoplazi ile ilişkili olarak nitelendiren ilk çalışmadır [10]. 16 olgudan oluşan bu çalışmada 11 olguda neoplazi ile ilişki saptanmış ve papiller hiperplazinin düşük dereceli papiller ürotelyal neoplazmların prekürsör lezyonu olabileceği yönünde yorum yapılmıştır. Ayrıca papiller ürotelyal neoplazi öyküsü bulunmayan bir hastada, papiller hiperplazi tanısını takiben hastalıksız en uzun süre 5 yıl olarak saptanmıştır.

Readal ve ark.'nın yaptığı çalışmada papiller hiperplazili 53 olgunun 35'inde (% 66) öncesi, eşzamanlı ya da sonrasında ürotelyal neoplazi ile ilişki bulunmuştur [2]. Daha önce ürotelyal neoplazisi olan 30 hastanın 11'inde (% 37) ve neoplazi öyküsü olmayan 23 hastanın 4'ünde (% 17) sonrasında mesane tümörü geliştiği saptanmıştır. Ayrıca papiller hiperplazinin öncesinde ve sonrasında en sık düşük dereceli neoplazi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Papiller hiperplazi tanısı konulduktan sonraki 5 yıllık neoplazi gelişme riski, papiller neoplazi öyküsü olmayan ve olan hastalar için sırasıyla %27,4 ve %47,8 olarak saptanmıştır.

MPBÜP *de novo* ya da öncesinde neoplazisi olan olguların takiplerinde saptanan bir ürotelyal lezyondur. Çalışmamızda 91 olgunun 23'ünde öncesinde neoplazi öyküsü mevcut olup, bunların %86,9'u düşük dereceli ürotelyal neoplazilerden oluşmaktaydı. En az 6 ay takibi olan 59 olgunun 27'sinde sonrasında neoplazi saptanmıştır. İlk tanısı ürotelyal hiperplazi olan bir olguda takiplerinde 33 ay sonra NİPÜK,D saptanmıştır. Olguların 73'ünde (%80,2) öncesi, eş zamanlı ya da sonrasında neoplazi ile ilişki bulunmuş, en sık birliktelik gösteren neoplazinin düşük dereceli ürotelyal neoplazi olduğu saptanmıştır.

Yapılan genetik ve moleküler çalışmalarda, ürotelyal hiperplazilerde düşük dereceli papiller karsinomlar gibi en sık görülen genetik değişiklik kromozom 9 delesyonu olarak saptanmıştır [3, 6, 7, 25]. En sık kromozom 9q [7] ve ardından 9p [7, 25] kaybının olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [3]. Chow ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 15 papiller hiperplazi vakasının 8'inde (%53) klonalite saptanmıştır. Aynı çalışmada öncesinde papiller hiperplazi olan bir vakada

3 yıl sonra papiller karsinom gelişmiş ve her iki lezyonda da aynı allelede kromozom 9q ve 9p da kayıp görülmüştür [3]. Oers ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 30 flat ürotelyal hiperplazili olgunun %37'sinde kromozom 9 delesyonu, % 23'ünde FGFR3 onkogen mutasyonu saptanmıştır. Ayrıca kromozom 9 kaybı gösteren hiperplazi vakalarında FGFR3 onkogen mutasyonu yok iken, mutant vakaların hepsinde kromozom 9 kaybı görülmüştür. Aynı çalışmada kromozom 9 delesyonlarının mesane kanserindeki en erken genetik değişiklik olduğu ve flat ürotelyal hiperplazide FGFR3 mutasyonun saptanmasının bu lezyonun papiller mesane kanserinin öncüsü olabileceği yönünde yorum yapılmıştır [7].

Mesane kanserli hastaların histolojik olarak normal görünen ürotelyumda da moleküler alternasyonlar görülebilmektedir. Chaturvedi ve ark.'nın mesane kanserli hastalarda mesaneyi haritalandırarak yaptığı çalışmada histolojisi benign olan ürotelyumda kromozom 17'nin farklı lokasyonlarında delesyon saptanmıştır [47]. Ayrıca başka bir çalışmada 6 mesane tümörlü hastadan alınan 12 normal ürotelyum biyopsinin 6'sında (% 50) kromozom 9 delesyonu bulunmuştur [6]. Bu da bize aslında tümör progresyonunun histopatolojideki değişikliklerin eşlik ettiği çok aşamalı genetik değişikliklerin birikmesi sonucu oluştuğunu düşündürmektedir. MPBÜP vakalarında genetik mutasyonun saptanmış olması ve histolojisindeki değişikliklerin tam oluşmaması da benzer bir durum olarak yorumlanabilir.

Prekanseroz ve kanseroz gelişim sırasında dokuda ilk olarak nükleer volümde artış görülmektedir. Keshtkar ve ark.'nın yaptığı çalışmada ürotelyumda bazal ve intermedier hücrelerin boyutlarında malign vakalarda benignlere göre anlamlı olarak artış saptanmıştır [48]. Poropatich ve ark.'nın yaptığı çalışmada nükleus boyutunun özellikle flat ürotelyal lezyonlar ve reaktif ürotelyal atipi ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir [45]. Bizim çalışmamızda neoplazi ile birlikte olan MPBÜP olgularında ortalama nükleus çapı 7,8µm ve neoplazi eşlik etmeyenlerde ise 7,7µm'dir. Eş zamanlı (p=0,579) ve/veya herhangi bir zamanda (p=0,912) neoplazi ile birlikte olan ve olmayan olgular arasında nükleus çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Ayrıca ortalama ürotelyum kalınlığı açısından eş zamanlı ve/veya herhangi bir zamanda neoplazi eşlik eden ve etmeyen olgular benzerdi.

İnflamasyon, biyolojik, kimyasal ve fiziksel etkenlere karşı kendi kendini sınırlayan bir ana savunma mekanizmasıdır [49]. Konakçı bağışıklık yanıtı, hasta prognozunun bir belirleyicisi olarak kabul edilir ve kansere bağlı inflamasyon, karsinogenezdeki kilit rolünü vurgulayan bir kanser belirteci olarak belirlenmiştir [50, 51]. Ürotelyal karsinomlarda ise inflamasyon çift rol oynamaktadır. Bir yandan, kronik inflamasyon mesane kanseri gelişimi için iyi belirlenmiş bir risk faktörü iken diğer yandan, inflamasyona neden olan intravezikal tedavi (*Basil Calmette-Guérin*), kanserin tekrarlanmasına karşı koruma sağlamaktadır [49]. Hodgson ve ark.'nın yaptığı çalışmada inflamasyonun hem rekürrenssiz yaşam hem de hastalısız yaşamın bağımsız bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir [52]. 428 primer yüzeyel mesane karsinomu vakası üzerinde yapılan bir çalışmada, tümörlerinde inflamatuvar reaksiyonu olan hastalarda, inflamasyonu olmayanlara göre anlamlı olarak daha az nüks ve kansere bağlı ölüm saptanmıştır [53]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda eş zamanlı neoplazi ile birlikte olan ve olmayan olgular arasında inflamasyon varlığının anlamlı bir etkisi olup ($p<0,001$) neoplazi gözlenmeyen olgularda inflamasyon daha yüksek oranda saptandı.

Noninvaziv ürotelyal lezyonların ayırımında immünohistokimya yardımcı bir yöntemdir. Biz de çalışmamızda neoplazi ile birlikteliği olan ve olmayan MPBÜP vakalarında CK20, P53 ve Ki67 ile immünohistokimyasal boyanma yönünden fark olup olmadığını araştırdık.

CK20 ile normal ürotelyumda süperfisyal hücrelerde boyanma görülmekte olup displastik ürotelyumda CK20 ekspresyonu disregüle olmaktadır [8]. CK20'nin süperfisyal şemsiye hücrelerinde boyanmasına normal; bunun haricindeki boyanma paterni ve boyanmanın olmamasına anormal boyanma paterni olarak tanımlayan çalışmalar mevcuttur [31, 54]. Çalışmamızda CK20 ile 64 (%83,1) vakada normal boyanma, 13 (%16,9) vakada anormal boyanma saptandı. Anormal boyanma gözlenen 13 vakanın 11'i eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 2'sinde eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Ancak neoplazi birlikteliği ile CK20 boyanma paterni arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,721$).

P53 ile normal ürotelyumda ve hiperplazide fokal oldukça zayıf boyanma görülmekte ya da hiç boyanma olmamaktadır [8, 9, 23]. Esrig ve ark.'nın yaptığı çalışmada P53'ün immunohistokimyasal olarak nükleer akümüasyonu ile P53 geninde mutasyon varlığı arasında güçlü bir ilişki saptanmıştır [55]. Ürotelyal karsinomların %40-60'ında P53 gen mutasyonu ve P53 proteininde immunohistokimyasal pozitiflik görülmektedir [9]. P53 mutasyonu neoplazmların preinvaziv evresinde görülebilmektedir [56]. Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak P53 71 (%92,2) vakada negatif, 6 (%7,8) vakada pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif saptanan 6 vakanın 3 ü eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 3'ünde eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Neoplazi birlikteliği ile P53 overekspresyonu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,118$).

Ürotelyal hiperplazi ve normal ürotelyumda Ki67 ile bazalde ve bazen epitel orta katmanının alt kısmında ($<10\%$) boyanma görülmektedir [8, 23]. Atipik papiller hiperplazili vakalarda yapılan bir çalışmada ise Ki-67 ile CIS'li 5 olgudan 3'ünde ve displastik ürotelyumlu 3 olgunun 2'sinde artmış proliferatif indeks saptanmıştır [27]. Çalışmamızda Ki67, 72 (%93,5) vakada düşük proliferasyon, 5 (%6,5) vakada yüksek proliferasyon olarak değerlendirildi. Yüksek proliferasyon gözlenen 5 vakadan 4'ü eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 1'inde eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Ancak neoplazi birlikteliği ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,999$). Bu sonuçlara göre MPBÜP'un immünohistokimyasal boyanmaya paterni genel olarak normal ürotelyum ile benzerdir. Bunun dışında (CK20'de anormal boyanma, P53'de overekspresyon ve Ki67'de yüksek proliferatif aktivite) gördüğümüz boyanma paternleri istatistiksel olarak anlamlı sonuç oluşturmamış olmasına rağmen malignite açısından uyarıcı olmalıdır.

Çalışmamız uzun bir zaman diliminde (9 yıl) ve geniş bir vaka popülasyonunda (91 olgu) retrospektif yapılmış olup MPBÜP'un neoplazi ile birlikteliği açısından anlamlı bulgular ortaya koymuştur. Ancak vakaların tümünün takipli olmaması ve takipli olanların düzenli aralıklarla takip edilmemesi prognostik veri analizi açısından kısıtlayıcı bir faktör olmuştur.

Sonuç olarak MPBÜP'un histomorfolojik ve immünohistokimyasal özellikleri neoplazi ile birlikte olup olmamasına göre değişmemektedir. MPBÜP'un sıklıkla düşük dereceli neoplazilerle birlikte görülmesi nedeni ile düşük dereceli neoplazilerin öncüsü ya da progresyonunda bir basamak olabilir. Bu nedenle özellikle tümör içermeyen biyopsi örneklerinde bu lezyonların fark edilmesi ve raporlanması hastanın takibi açısından kritik önem taşımaktadır. Bu açıdan yapılacak prospektif çalışmalar MPBÜP'un insidansı, prevelansı, prognostik ve prediktif değeri üzerine daha detaylı veriler ortaya koyacaktır.



6. SONUÇLAR

- Çalışmaya 91 olgu dahil edilmiştir.
- Çalışmaya katılan olguların 79'u (%86,8) erkek, 12'si (%13,2) kadındır.
- Olguların yaş aralığı 39-88 olup yaş ortalaması 66,7 ($\pm 10,7$)'dir.
- Olguların 73'ünde (%80,2) herhangi bir zamanda (öncesinde/sonrasında/eş zamanlı) neoplazi ile ilişki saptanmıştır.
- Olguların 67'sinde (%73,6) MPBÜP ile eşzamanlı neoplazi mevcuttu. Bu olguların 38'i (%56,7) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 29'u (%43,3) yüksek dereceli ürotelyal neoplazi vakalarından oluşmaktaydı.
- MPBÜP saptanan vakaların 23'ünde öncesinde neoplazi mevcuttu. Bunların 20'si (%86,9) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 3'ü (%13,1) yüksek dereceli ürotelyal neoplazi vakalarından oluşmaktaydı.
- En az 6 ay takibi olan 59 olgunun 27'sinde sonrasında neoplazi ile ilişki saptanmıştır. Bunların 17'si (%63) düşük dereceli ürotelyal neoplazi, 10'u (%33,3) yüksek dereceli ürotelyal neoplaziden oluşmaktaydı.
- Öncesinde neoplazisi olan 23 olgunun 15'inde MPBÜP tanısı sonrasında da neoplazi saptanmıştır. Ayrıca bu 15 olgunun 12'sinde eş zamanlı neoplazi de mevcuttu. Kalan 3 vakada eş zamanlı neoplazi yok iken öncesinde ve sonrasında NİPÜK,D saptanmıştır.
- Öncesinde neoplazi saptanmayan 68 olgunun 12' sinde MPBÜP tanısı sonrasında da neoplazi saptanmıştır. Ayrıca bu 12 olgunun 11'inde eş zamanlı neoplazi de mevcuttu. Kalan bir olguda ise sadece sonrasında NİPÜK,D saptanmıştır. Bu olguda MPBÜP tanısından tümör gelişimine kadar geçen süre 33 aydır.
- Eş zamanlı İÜK,D tanısı olan üç vakada sonrasında İÜK,Y; eşzamanlı NİPÜK,D tanısı olan bir vakada sonrasında İÜK,D ve eş zamanlı ÜD tanısı olan bir vakada sonrasında İÜK,Y saptanmıştır. Öncesinde ve eş zamanlı NİPÜK,D olan bir vakada sonrasında İÜK,Y ve öncesinde displazi, eş zamanlı DMPÜN tanısı olan bir vakada sonrasında NİPÜK,D saptanmıştır.
- 91 olgunun 82'sinde (%90,1) ondülasyon, 51'inde (%56,0) inflamasyon izlenmiştir.

- Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ondulasyon varlığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,694$).
- Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede inflamasyon varlığının anlamlı bir etkisi olup ($p<0,001$) neoplazi gözlenmeyen grupta inflamasyon daha yüksek oranda görülmektedir.
- Ürotelyum kalınlığı $98,92 \mu\text{m}$ ile $328,54 \mu\text{m}$ arasında değişmekte olup ortalama ürotelyum kalınlığı $192,03(\pm 47,27)$ 'tür.
- Nükleus çapı $5,5 \mu\text{m}$ ile $10,37 \mu\text{m}$ arasında değişmektedir. Ortalama nükleus çapı $7,73(\pm 0,98)$ 'tür.
- Eş zamanlı neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grup arasında sırasıyla; ortalama ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,790$ ve $p=0,579$).
- Eş zamanlı neoplazilerin tümör derecelerine göre MPBÜP'un nükleus çaplarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,475$).
- Herhangi bir zamanda neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grup arasında sırasıyla; ortalama ürotelyum kalınlığı ve nükleus çapı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,898$ ve $p=0,912$).
- Herhangi bir zamanda neoplazi eşlik eden grup ile neoplazi eşlik etmeyen grubu ayırt etmede ürotelyum kalınlığına ait ROC eğrisi altında kalan alan $0,504$ (%95 Güven Aralığı: $0,356-0,651$) olup söz konusu ölçümlerin istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi ($p=0,960$). Nükleus çapına ait ROC eğrisi altında kalan alan ise $0,509$ (%95 Güven Aralığı: $0,343-0,674$) olup söz konusu ölçümlerin istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir belirleyiciliği görülmedi ($p=0,909$).
- CK20 ile 64 (%83,1) vakada normal boyanma, 13 (%16,9) vakada anormal boyanma izlendi. Anormal boyanma gözlenen 13 vakanın 11 'i eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 2 'si eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Ancak neoplazi birlikteliği ile CK20 boyanma paterni arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,721$).
- P53, 71 (%92,2) vakada negatif, 6 (%7,8) vakada pozitif olarak değerlendirildi. Pozitif saptanan 6 vakanın 3 ü eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 3 'ünde eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Neoplazi birlikteliği ile P53 overekspresyonu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,118$).

- Ki67, 72 (%93,5) vakada düşük proliferasyon, 5 (%6,5) vakada yüksek proliferasyon olarak değerlendirildi. Yüksek proliferasyon gözlenen 5 vakadan 4'ü eş zamanlı neoplazi ile birlikte iken 1'inde eş zamanlı neoplazi mevcut değildi. Ancak neoplazi birlikteliği ile Ki67 proliferasyon indeksi arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,999$).
- Çalışmamız uzun bir zaman diliminde (9 yıl) ve geniş bir vaka popülasyonunda (91 olgu) retrospektif yapılmış olup MPBÜP'un neoplazi ile birlikteliği açısından anlamlı bulgular ortaya koymuştur. Ancak vakaların tümünün takipli olmaması ve takipli olanların düzenli aralıklarla takip edilmemesi prognostik veri analizi açısından kısıtlayıcı bir faktör olmuştur.
- MPBÜP'un sıklıkla düşük dereceli neoplazilerle birlikte görülmesi nedeni ile düşük dereceli neoplazilerin öncüsü ya da progresyonunda bir basamak olabilir. Bu nedenle özellikle tümör içermeyen biyopsi örneklerinde bu lezyonların fark edilmesi ve raporlanması hastanın takibi açısından kritik önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Humphrey, P.A., et al., The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 2016. 70(1): p. 106-119.
2. Readal, N. and J.I. Epstein, Papillary urothelial hyperplasia: relationship to urothelial neoplasms. *Pathology*, 2010. 42(4): p. 360-3.
3. Chow, N.H., et al., Papillary urothelial hyperplasia is a clonal precursor to papillary transitional cell bladder cancer. *Int J Cancer*, 2000. 89(6): p. 514-8.
4. Jaworski, D., et al., Diagnostic difficulties in cases of papillary urothelial neoplasm of low malignant potential, urothelial proliferation of uncertain malignant potential, urothelial dysplasia and urothelial papilloma: A review of current literature. *Ann Diagn Pathol*, 2017.
5. Holger Moch, P.A.H., Thomas M. Ulbright, Victor E. Reuter, WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. 2016, Lyon Cedex 08 France International Agency for Research on Cancer (IARC)
6. Hartmann, A., et al., Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol*, 1999. 154(3): p. 721-7.
7. van Oers, J.M., et al., Chromosome 9 deletions are more frequent than FGFR3 mutations in flat urothelial hyperplasias of the bladder. *Int J Cancer*, 2006. 119(5): p. 1212-5.
8. Petraki, C.D. and C.P. Sfikas, Review. Non-papillary urothelial lesions of the urinary bladder: morphological classification and immunohistochemical markers. *In Vivo*, 2008. 22(4): p. 493-501.
9. Cina, S.J., et al., Correlation of Ki-67 and p53 with the new World Health Organization/International Society of Urological Pathology Classification System for Urothelial Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med*, 2001. 125(5): p. 646-51.
10. Taylor, D.C., et al., Papillary urothelial hyperplasia. A precursor to papillary neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 1996. 20(12): p. 1481-8.
11. Mills, S.E., *Histology For Pathologists*. Vol. 4. 2012. 971-986.
12. Mills, S.E., *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. 5 ed. 2010. 1829-1869.
13. Gökmen, F.G., *Sistemik Anatomi. Üriner Sistem*, ed. N. İçten. 2003, İzmir: İzmir Güven Kitabevi.

14. Emil A. Tanagho, M., Jack W. MacAninch, MD, Smith & Tanagho's General Urology 2012.
15. EA, T., Campbell's Urology. Anatomy of the lower urinary tract, ed. W.P.e. al. Vol. 1. 1992.
16. Frank H. Netter, M., Atlas of human anatomy. 2010, Saunders.
17. Bolla, S.R. and R. Jetti, Histology, Bladder, in StatPearls. 2019, StatPearls PublishingLLC.: Treasure Island (FL).
18. Eroschenko, V.P., diFiore's Atlas of Histology with Functional Corelations. 2013, Ankara: Palme Yayıncılık. 442-450.
19. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. 68(6): p. 394-424.
20. Lopez-Beltran, A., et al., Preneoplastic non-papillary lesions and conditions of the urinary bladder: an update based on the Ancona International Consultation. Virchows Arch, 2002. 440(1): p. 3-11.
21. Montironi, R. and A. Lopez-Beltran, The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. Int J Surg Pathol, 2005. 13(2): p. 143-53.
22. Epstein, J.I., et al., The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. Am J Surg Pathol, 1998. 22(12): p. 1435-48.
23. Montironi, R., et al., Morphological diagnosis of urothelial neoplasms. J Clin Pathol, 2008. 61(1): p. 3-10.
24. Epstein, J.I., Diagnosis and classification of flat, papillary, and invasive urothelial carcinoma: the WHO/ISUP consensus. Int J Surg Pathol, 2010. 18(3 Suppl): p. 106s-111s.
25. Obermann, E.C., et al., Frequent genetic alterations in flat urothelial hyperplasias and concomitant papillary bladder cancer as detected by CGH, LOH, and FISH analyses. J Pathol, 2003. 199(1): p. 50-7.
26. Lopez-Beltran, A., et al., Urothelial dysplasia of the bladder: diagnostic features and clinical significance. Anal Quant Cytopathol Histopathol, 2013. 35(3): p. 121-9.
27. Swierczynski, S.L. and J.I. Epstein, Prognostic significance of atypical papillary urothelial hyperplasia. Hum Pathol, 2002. 33(5): p. 512-7.
28. Moll, R., Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. Acta Histochem Suppl, 1991. 41: p. 117-27.

29. Moll, R., et al., Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*, 1992. 140(2): p. 427-47.
30. Moll, R., D.L. Schiller, and W.W. Franke, Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol*, 1990. 111(2): p. 567-80.
31. Harnden, P., N. Mahmood, and J. Southgate, Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. *Lancet*, 1999. 353(9157): p. 974-7.
32. Mumtaz, S., et al., Diagnostic utility of p53 and CK20 immunohistochemical expression grading urothelial malignancies. *Int Arch Med*, 2014. 7: p. 36.
33. Lin, S., et al., Cytokeratin 20 as an immunocytochemical marker for detection of urothelial carcinoma in atypical cytology: preliminary retrospective study on archived urine slides. *Cancer Detect Prev*, 2001. 25(2): p. 202-9.
34. Gerdes, J., et al., Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 1983. 31(1): p. 13-20.
35. Ben Abdelkrim, S., et al., Expression of topoisomerase II alpha, ki67, and p53 in primary non-muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. *J Immunoassay Immunochem*, 2014. 35(4): p. 358-67.
36. Scholzen, T. and J. Gerdes, The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 2000. 182(3): p. 311-22.
37. Li, L.T., et al., Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*, 2015. 11(3): p. 1566-72.
38. Wang, L., et al., Prognostic value of Ki67 and p63 expressions in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. *Int Urol Nephrol*, 2016. 48(4): p. 495-501.
39. Ogata, D.C., et al., Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (PTA E PT1): correlation of expression of P53, KI-67 and CK20 with histologic grade, recurrence and tumor progression. *Rev Col Bras Cir*, 2012. 39(5): p. 394-400.
40. Lane, D.P. and L.V. Crawford, T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979. 278(5701): p. 261-3.
41. Lane, D.P. and A.K. Robbins, An immunochemical investigation of SV40 T antigens. 1. Production properties and specificity of rabbit antibody to purified simian virus 40 large-T antigen. *Virology*, 1978. 87(1): p. 182-93.
42. Lane, D.P., Cell immortalization and transformation by the p53 gene. *Nature*, 1984. 312(5995): p. 596-7.

43. Wang, L., et al., Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol*, 2014. 35(4): p. 2989-95.
44. Boyd, M.T. and N. Vlatkovic, p53: a molecular marker for the detection of cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 2008. 2(9): p. 1013-24.
45. Poropatich, K., et al., Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. *Diagn Pathol*, 2016. 11(1): p. 57.
46. Andersson, K.E. and K.D. McCloskey, Lamina propria: the functional center of the bladder? *Neurourol Urodyn*, 2014. 33(1): p. 9-16.
47. Chaturvedi, V., et al., Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. *Oncogene*, 1997. 14(17): p. 2059-70.
48. Keshtkar, A., A. Keshtkar, and P. Lawford, Cellular morphological parameters of the human urinary bladder (malignant and normal). *Int J Exp Pathol*, 2007. 88(3): p. 185-90.
49. Nesi, G., et al., Chronic inflammation in urothelial bladder cancer. *Virchows Arch*, 2015. 467(6): p. 623-633.
50. Colotta, F., et al., Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 2009. 30(7): p. 1073-81.
51. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010. 140(6): p. 883-99.
52. Hodgson, A., et al., Tumour front inflammation and necrosis are independent prognostic predictors in high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol*, 2018. 71(2): p. 154-160.
53. Flamm, J., Tumor-associated tissue inflammatory reaction and eosinophilia in primary superficial bladder cancer. *Urology*, 1992. 40(2): p. 180-5.
54. Burger, M., et al., Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade. *Br J Cancer*, 2007. 96(11): p. 1711-5.
55. Esrig, D., et al., p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*, 1993. 143(5): p. 1389-97.
56. Soini, Y., et al., p53 immunohistochemistry in transitional cell carcinoma and dysplasia of the urinary bladder correlates with disease progression. *Br J Cancer*, 1993. 68(5): p. 1029-35.

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

I- Kişisel Bilgiler

Adı- Soyadı	Münire Çağın
Doğum yeri ve tarihi	Serik-03/01/1987
Uyruğu	T.C.
Yabancı dili	İngilizce
İletişim adresi	Şehit Ömer Halisdemir Cd. No:12 Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi- Patoloji Bölümü Altındağ/ANKARA
E-posta adresi ve telefon numarası	mdcagin@gmail.com - 0(544) 460 66 11

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2016 Mayıs--	T.C. Sağlık Bakanlığı SBÜ Ankara Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği
2013-2016	Mevlana Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı
2005- 2012	Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
2001- 2005	Serik Anadolu Lisesi
1998- 2001	Kazım Karabekir İlköğretim Okulu
1993- 1998	Belkıs İlkokulu

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

Ordu Aybastı Toplum Sağlığı Merkezi	Pratisyen Hekim	2012 -- 2013
Mevlana Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı	Asistan Hekim	2013 -- 2016
Ankara Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği	Asistan Hekim	2016 Mayıs -- ...

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Patoloji Dernekleri Federasyonu
2. Ankara Patoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

2019	Hidroksiklorin Kullanımına bağlı gelişen steroide dirençli akut generalize ekzamatöz püstülozis olgusunda siklosporin tedavisi, sözel bildiri, Dermatolojide Gelişmeler Kongresi, 22-26 Mayıs 2019, İzmir <u>Melis Bal</u> ¹ , Selda Pelin Kartal ¹ , Müzeyyen Gönül ¹ , Ünsal Han ² , Münire Çağın ²
2018	Memede nadir mezenkimal tümör; dermatofibrosarkom protuberans – olgu sunumu, EPS390, 28. Ulusal Patoloji Kongresi 27-30 Ekim 2018, Ankara <u>Münire Çağın</u> ¹ , Demet Yılmaz ¹

2018	Olgu Sunumu: Nazal Pasajda Glomanjioperisitoma, EPS017, 28. Ulusal Patoloji Kongresi 27-30 Ekim 2018, Ankara <u>Ayşegül Aksakal Uslu</u>¹, Aysun Gökçe¹, Münire Çağın¹
2017	Olgularla otoimmün büllöz hastalıkların dermatolojik immünofloresan ve histomorfolojik bulguları, PS629, 27. Ulusal Patoloji Kongresi, 15-18 Kasım 2017, Antalya Münire Çağın¹, Deniz Ateş Özdemir², <u>Fatma Aksoy Khurami</u>¹, Betül Erdem³, Müzeyyen Gönül³
2017	Pnömoni tedavisi gören dev mediasten kitle olgusu, EP033, 39. TÜSAD Ulusal kongresi 14-17 Ekim 2017, İzmir <u>Kubilay İnan</u>¹, Derya Köroğlu Balcı¹, Derya Özyörük², Zeliha Güzelküçük², Münire Çağın³, Ata Türker Arıkök³
2017	A case of pemphigus herpetiformis with oral, perianal an vulvar involvement, 3307, 26th EADV Congress 13-17 September 2017, Geneva, Swithzerland <u>Müzeyyen Gönül</u>¹, Betül Erdem¹, Selda Pelin Kartal¹, Bengü Çevirgen Cemil¹, Erkan Davarcı¹, Münire Çağın², Murat Alper²

VII- Diğer Bilgiler

10-11 Mayıs 2014 Ankara	Sorular ve Olgularla Jinekopatoloji Güncellemesi
19-23 Kasım 2014 Trabzon	24. Ulusal Patoloji Kongresi
28 Şubat - 01 Mart 2015 Adana	Olgularla Mesane, Prostat ve Testis Tümörleri Kursu

30 Nisan - 3 Mayıs 2015 Konya	13. Ulusal Sinirbilim Kongresi Tıbbi İstatistik Temel Uygulamaları Kursu
30 Mayıs 2015 Konya	Mide Kanserinde İnteraktif HER2 Değerlendirme Toplantısı
14-17 Ekim 2015 Bursa	25. Ulusal Patoloji Kongresi & 6. Sitopatoloji Kongresi
18-19 Şubat & 18-19 Mart 2017 Ankara	6. Patoloji Kış Okulu
27-30 Ekim 2018 Ankara	28. Ulusal Patoloji Kongresi
23-24 Şubat & 13-14 Nisan 2019 Ankara	8. Patoloji Kış Okulu
8 Nisan 2019 Ankara	Erişkin İleri Yaşam Desteği

EK 2. TEZ KONUSU HAKEM DEĞERLENDİRME FORMU

TEZ KONUSU HAKEM DEĞERLENDİRME FORMU

Öğrenci Adı Soyadı:	MÜNİRE ÇAÇIN
Kurumu:	SBÜ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Uzmanlık Alanı:	Tıbbi Patoloji
DEĞERLENDİRME	
1-Tez Başlığı/Konusu:	DSÖ 2016 klasifikasyonu ile tanımlanan 'malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon' un prognostik ve prediktif değeri üzerine histomorfolojik ve immunohistokimyasal analiz.
2-Araştırma sorusu:	Daha önce hiperplazi kategorisinde değerlendirilmekte olan malignite ile herhangi bir şekilde ilişkilendirilmeyen ancak, DSÖ 2016 klasifikasyonu ile 'malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon' başlıklı yeni bir kategori altında incelenmeye başlanan lezyonların ürotelyal karsinom ile birlikteliği ve/veya karsinoma progresyon oranı nedir?
3-Araştırmanın amacı:	'Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon' un malignite ile ilişkisini immunohistokimyasal bulgular ve takip verileri eşliğinde değerlendirmek.
4-Araştırma materyalleri, popülasyonu:	Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji kliniğinde Ocak-2007-Ocak 2016 yılları arasında değerlendirilmiş mesane TUR materyallerine ait arşiv lamaları dokümanite edilerek ve gözden geçirilerek doğrudan 'ürotelyal hiperplazi' tanısı alan olgular yanısıra farklı kategoride bir tanı ile raporlanmış ancak komşuunda ürotelyal hiperplazi odağı içeren olgular çalışmaya dahil edilecektir. Ayrıca bu vakalara immunohistokimyasal olarak CK20, P53, Ki67 uygulanacak ve çalışmaya dahil edilen tüm vakalar için takip verileri (neoplastik gelişim açısından) toplanacaktır.
5-Dahil etme ve hariç tutma kriterleri:	Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji kliniğine Ocak 2007-Ocak 2016 yılları arasında gönderilen mesane TUR materyallerinin tümü taranarak arasından ürotelyal hiperplazi tanısı almış ve/veya ürotelyal hiperplazi odağı içeren olgular dahil edilecek olup ürotelyal hiperplazi odağı içermeyen tüm olgular çalışma dışı tutulacaktır.
6-Araştırmanın birincil sonuç değişkenleri:	Eş zamanlı karsinom odağı, takip süresinde karsinom gelişimi.
7-Araştırmanın türü ve tasarımı:	Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji kliniği arşivindeki Ocak 2007-Ocak 2016 yılları arası mesane TUR materyallerine ait lamalar ve parafin bloklardan elde edilen kesitler kullanılarak yapılacak retrospektif bir çalışmadır. Çalışma ayrıca hastaların takip verilerini de içerecektir.
8- Araştırma hipotezi:	H0: Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyonun ürotelyal karsinom gelişimi ve/veya birlikteliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi yoktur. H1: Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyonun ürotelyal karsinom gelişimi ve/veya birlikteliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi vardır.
9-Örneklem sayısı ve belirleme yöntemi:	Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji kliniğinde Ocak-2007-Ocak 2016 yılları arasında raporlanmış mesane TUR materyalleri dokümanite edilen tüm lamalar ışık mikroskopik olarak değerlendirilecektir. Olgulardan ürotelyal hiperplazi odağı içerenlerin hepsi (karsinom ile birlikte veya değil) çalışmaya dahil edilecektir. Seçilen olgulara immunohistokimyasal yöntem ile CK20, P53, Ki67 uygulanacak olup morfolojik ve immunohistokimyasal bulgular hastaların takip verileri (neoplastik gelişimi var/yok) eşliğinde analiz edilecektir.
10-Araştırmada kullanılacak istatistik yöntemler:	Bağımsız gruplar karşılaştırılırken parametrik varsayımlar sağlandığında iki grup için t-testi, grup sayısı ikiden büyük olduğunda ise tek yönlü varyans analizi kullanılacaktır. Parametrik varsayımlar sağlanmadığı takdirde iki grup için Mann Whitney U-testi, grup sayısı ikiden büyük olduğunda ise Kruskal Wallis testi kullanılacaktır. Nitel değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Pearson ki-kare ve Fisher'in kesin testi kullanılacaktır. Çok değişkenli analizler için lojistik regresyon ve Cox regresyon yöntemleri kullanılacaktır. Çok değişkenli analizlerde değişken seçimi için adimsal regresyon yöntemi kullanılacaktır.
11-Araştırmanın orijinalliği ve bilime katkısının açıklaması:	Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon (MPBÜP) türler sistem 2016 DSÖ klasifikasyonunda ilk kez tanımlanan bir terminolojidir. Bu olgular daha önce genellikle ürotelyal hiperplazi başlığı altında değerlendirilmiş yada prognostik bir değer taşımadığı öngörüldüğünden tanısal açıdan patoloj tarafından spesifiye edilmemiştir. Ancak malignite kuşkusunu oluşturacak şekilde klasifikasyona girmiş olmasına rağmen bu lezyon grubunun malignite ile ilişkisi açısından net veriler henüz ortada yoktur. Ayrıca çalışmaların ortaya koyduğu çelişkili sonuçlar patolojilerin söz konusu lezyonları değerlendirmesi ve isimlendirmesi açısından da zaman zaman güçlükler oluşturmaktadır. Biz de çalışmamızda MPBÜP olgularının malignite ile (progresyon ve/veya birliktelik) ne düzeyde korelasyon gösterdiğini araştırmayı amaçladık.
12-Açıklamak istediğiniz diğer konular:	
Hakemin kararı:	(X) Tez konusu uygundur. Bu çalışmanın; DSÖ 2015 ürotelyal tümörlerin sınıflandırılmasında non-invaziv ürotelyal lezyonlar grubunda yeni tanımlanan 'Malignite potansiyeli belirsiz ürotelyal proliferasyon' grubunun patolojiler için farkındalık yaratacağını ve literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyim.
HAKEM ADI SOYADI:	Doç. Dr. İSMAİL YILMAZ
KURUMU:	SBÜ Sultan Abdülhamid Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Srv.
TARİH:	05/09/2018

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HİSTOPATOLOJİ VE İMMÜNOHİSTOKİMYA ANABİLİM DALI
Doç. Dr. İsmail YILMAZ
Tıbbi Patoloji Uzmanı
Dp. Ys/ No/101638

TEZ KONUSU HAKEM DEĞERLENDİRME FORMU

Öğrenci Adı Soyadı	MÜNİRE ÇAĞIN
Kurumu	SBÜ ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT EAH
Uzmanlık Alanı	TIBBİ PATOLOJİ
	DEĞERLENDİRME
1-Tez Başlığı/Konusu:	TEZ BAŞLIĞI ÇALIŞMANIN İÇERİĞİNİ YANSITIR NİTELİKTEDİR
2-Araştırma sorusu:	TEZİN İÇERİĞİNİ KAPSAMAKTADIR
3-Araştırmanın amacı:	BELİRTİLMİŞ VE AÇIKLANMIŞTIR.
4-Araştırma materyalleri, popülasyonu:	SEÇİLEN POPÜLASYON ÇALIŞMA NİTELİĞİNE UYGUNDUR
5-Dahil etme ve hariç tutma kriterleri:	DAHİL ETME VE HARİÇ TUTMA KRİTERLERİ UYGUNDUR
6-Araştırmanın birincil sonuç değişkenleri:	BİRİNCİL SONUÇ DEĞİŞKENLERİ UYGUNDUR
7-Araştırmanın türü ve tasarımı:	TASARIMI UYGUNDUR
8- Araştırma hipotezi:	HİPOTEZ UYGUNDUR
9-Örneklem sayısı ve belirleme yöntemi:	ÖRNEKLEM SAYISI YETERLİ VE BELİRLEME YÖNTEMİ UYGUNDUR
10-Araştırmada kullanılacak istatistik yöntemler:	UYGUNDUR
11-Araştırmanın orijinalliği ve bilime katkısının açıklaması:	UYGUNDUR
12-Açıklamak istediğiniz diğer konular:	YOK
Hakemin kararı	(.....X....) Tez konusu uygundur. (....) Tez konusu açıklanan eksiklikler giderilmesi şartı ile uygundur. Tekrar değerlendirmeye gerek yoktur. (.....) Açıklanan eksiklikler giderildikten sonra tez konusu tekrar değerlendirilmelidir. (.....) Tez konusu uygun değildir. Yeni tez konusu önerisi gönderilmelidir.
HAKEM ADI SOYADI: KURUMU: TARİH:	NAGEHAN ÖZDEMİR BARIŞIK SBÜ KARDAL DR. LÜTFİ KIRDAR EAH PATOLOJİ KLİNİĞİ 6.09.2018

*Bilgisayar ortamında doldurulmalıdır.

**Lütfen değerlendirmelerinizi açıklayınız.

EK 3. ETİK KURUL ONAYI



T.C. Sağlık Bakanlığı
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Dışkapı Yıldırım Beyazıt
Eğitim ve Araştırma Hastanesi



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR TARİHİ: 07.01.2019

KARAR NO : 58/07

Hastanemiz Patoloji Kliniğinde Doç.Dr. Evrim ÖNDER sorumluluğunda yapılması planlanan Dr. Münire ÇAĞIN' a ait "2016 DSÖ Klasifikasyonu ile Tanımlanan 'Malignite Potansiyeli Belirsiz Ürotelyal Proliferasyon' un Prognostik ve Prediktif Değeri Üzerine Histomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Analiz" konulu tez çalışması amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına, bütçenin Hastanemiz Bilimsel Araştırma Proje Destekleme (BAP) komisyonu tarafından karşılanması şartı ile toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Güleser SAYLAM
Başkan

Prof. Dr. S.İbrahim AKDAĞ
Başkan Yard.

Uz. Dr. S. Dincer YETİŞ
Üye

Prof. Dr. Fatih YALÇINKAYA
Üye

Doç. Dr. Huriye HAYAT GÜVEN
Üye

Yrd. Doç. Dr. Burcu KÜÇÜK BİÇER
Üye

Prof. Dr. Sibel ÖRSEL
Üye

Doç. Dr. Jülide ERGİL
Üye

Prof. Dr. E. Pelin KELİCEN UĞUR
Üye

Av. Harun KOZAN
Üye

B.M.M. Burcu DEMİR
Üye

Hülya BALA
Üye

EK 4. CK20 DATASHEET



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Cytokeratin 20
Clone K₂₀.8
Ready-to-Use
(Link)

Code IR777

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20, Clone K ₂₀ .8, Ready-to-Use (Link), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Autostainer Link instruments. This antibody labels normal and abnormal gastric and intestinal epithelium, urothelium and Merkel cells (1, 2), and this antibody is a useful aid in the classification of carcinomas originating from these cell types (1, 3-5). Differential classification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.
Synonym for antigen	Protein IT (6).
Summary and explanation	Cytokeratin 20 (CK 20) belongs to the intermediate filament proteins, which create a cytoskeleton in almost all cells. In contrast to other intermediate filaments, cytokeratins (CKs) are made up of a highly complex multigene family of 40 to 68 kDa polypeptides (1, 7). 20 distinct CK polypeptides have been revealed in various human epithelial cells and their malignant counterparts (1, 2, 7). They can be divided into an acidic (type I) and a neutral-basic (type II) subfamily. CK 20, a 46 kDa protein, is less acidic than the other type I cytokeratins. CK 20 labeling (5-100% CK-20-labeled tumor cells) has been reported in the vast majority of adenocarcinomas of the colon, mucinous ovarian tumors, transitional-cell and Merkel cell carcinomas, and frequently also in adenocarcinomas of the stomach, bile system, and pancreas. Very few breast and lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas were labeled, while adenocarcinomas of the ovary (non-mucinous) and endometrium, and renal cell and small cell carcinomas showed only scattered labeled cells in some cases (1). Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure; Materials Required; Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Troubleshooting; Interpretation of Staining; General Limitations.
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide. Clone: K ₂₀ .8 (1). Isotype: IgG2a, kappa.
Immunogen	CK 20 isolated by SDS-PAGE from cytoskeletal material obtained from human duodenal mucosa (1).
Specificity	In Western immunoblotting of SDS-PAGE-separated cytoskeletal proteins from human duodenal mucosa, the antibody labels a 46 kDa polypeptide corresponding to CK 20 (1).
Precautions	- For in vitro diagnostic use. - For professional users. - This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. - As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. - Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. - Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation	The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004) <u>Paraffin-embedded sections:</u> Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method. <u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using an aqueous or a permanent mounting method. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.
Staining procedure	The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Link) (Code K8000). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the used Autostainer instrument, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008). Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include colon and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code IR750).

SSIR777CEEFG_01 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Product-specific limitations	CK 20 may occasionally be expressed in breast and lung adenocarcinomas and in squamous cell carcinomas (1, 3). Less than 5% CK-20 labeled cells may be present in a number of tissues (1).
Staining interpretation	Cells labeled by the antibody display cytoplasmic staining.
Performance characteristics	Normal tissues: The antibody labels normal urothelium (1, 4) and the mature epithelium lining the villi of duodenal mucosa (1). CK 20 immunoreactivity has not been detected in a number of non-epithelial tissues tested, such as smooth muscle, blood vessel walls, lymph nodes and tumor stroma (1). In columnar epithelial cells in colon, the luminal cells show a moderate to strong staining reaction, whereas the basal to intermediate cells show a weak to moderate staining reaction. Abnormal tissues: In colonic adenocarcinoma, the antibody labeled 26 of 27 tumors (96%). 21 (78%) displayed staining in more than 50% of the cells (3). Of 51 patients with urothelial papillomas of the bladder, 10 showed labeling of superficial urothelial cells (normal labeling) with the antibody. By contrast, 30 patients (73%) showed CK 20 expression in all cell layers (abnormal labeling) (4). 3 out of 4 metastatic gastric tumors were labeled by the antibody (5). Focal immunostaining with the antibody (less than 10% labeled cells) was observed in 9 of 65 lung, 1 of 20 breast, and 2 of 11 endometrial tumors. 1 of 19 clear-cell type renal cell carcinomas was labeled in 10-50% of the cells (3). None of 10 primary ovarian carcinomas, and none of 5 mesotheliomas were found labeled by the antibody (5).

FRANÇAIS

Utilisation prévue	Pour utilisation diagnostique in vitro.
Synonyme de l'antigène	Protéine IT (6).
Résumé et explication	La cytokératine 20 (CK 20) fait partie des filaments intermédiaires, qui créent un cytosquelette dans presque toutes les cellules. À la différence des autres filaments intermédiaires, les cytokératines (CK) sont constituées d'une famille multigénique hautement complexe de polypeptides de 40 à 68 kDa (1, 7). On a recensé 20 CK différentes dans diverses cellules épithéliales humaines et leurs homologues tumorales (1, 2, 7). Les CK peuvent être divisées en sous-familles : type I acide et type II neutre-basique. La CK 20, une protéine de 46 kDa, est moins acide que les autres cytokératines de type I. La CK 20 a été marquée (5 à 100% de cellules tumorales marquées à la CK 20) dans la majeure partie des adénocarcinomes du côlon, des tumeurs ovariennes muqueuses, des carcinomes à cellules transitionnelles et à cellules de Merkel et également souvent dans les adénocarcinomes de l'estomac, du système biliaire et du pancréas. Très peu d'adénocarcinomes du sein et du poulmon et de carcinomes à cellules squameuses ont été marqués, alors que les adénocarcinomes de l'ovaire (non muqueux) et de l'endomètre, ainsi que les carcinomes à cellules rénales et à petites cellules ont montré uniquement des cellules marquées isolées dans certains cas (1). Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du kit de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.
Réactif fourni	Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.
Immunogène	CK 20 isolée par SDS-PAGE de matériau cytosquelettique obtenu à partir de muqueuse duodénale humaine (1).
Spécificité	Dans les analyses par Western immunoblot de protéines cytosquelettiques séparées par SDS-PAGE de la muqueuse duodénale humaine, l'anticorps marque un polypeptide de 46 kDa correspondant à la CK 20 (1).
Précautions d'emploi	- Pour utilisation diagnostique in vitro. - Pour utilisateurs professionnels. - Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations. - Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées. - Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau. - Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
Conservation	Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.
Préparation des échantillons	L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm. Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004). Coupes incluses en paraffine : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation des échantillons pour Dako PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent. Coupes déparaffinées : Le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine, déjà décrite. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).
Procédure de coloration	Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Link) (réf. K8000). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est le suivant : 1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. Se reporter au Guide d'utilisation de l'Autostainer Link correspondant pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur l'instrument Autostainer utilisé, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante.

SSIR777CEEFG_01 p. 2/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link und nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Nach Durchführung des Färbeverfahrens müssen die Objektträger unter Verwendung eines geeigneten permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden. Während der Gewebepreparation oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, High pH (Link) (Code-Nr. K8000). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Das empfohlene Reagenzvolumen beträgt 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code-Nr. K8008) ausgeführt werden.

Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativ-Kontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Dickdarmgewebe enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code-Nr. IR750).

Produktspezifische Beschränkungen

CK-20 kann gelegentlich in Adenokarzinomen von Brust und Lunge und in Plattenepithelkarzinomen (1, 3) exprimiert werden. Bis zu 5% CK-20-markierte Zellen können in verschiedenen Geweben auftreten (1).

Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen ein zytoplasmatisches Färbemuster auf.

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: Der Antikörper markiert gesundes Urothel (1, 4) und das ausgereifte Epithel entlang der Zotten der Duodenalmukosa (1). In einer Reihe von nicht-epithelialen Geweben, wie z. B. glatter Muskulatur, Blutgefäßwänden, Lymphknoten und Tumorstroma wurde keine CK-20-Immunreaktivität nachgewiesen (1). In säulenförmigen Epithelzellen im Dickdarm zeigen die Luminalzellen eine mäßige bis starke Färbereaktion, die Basal- und die Intermediärzellen dagegen nur eine schwache bis mäßige Färbereaktion.

Anomale Gewebe: In Dickdarm-Adenokarzinomen markierte der Antikörper 26 von 27 Tumoren (96%). 21 (78%) zeigten eine Färbung in mehr als 50% der Zellen (3). Von 51 Patienten mit Urothelkarzinom der Blase zeigten 10 eine Markierung von Urothelzellen an der Oberfläche (normale Markierung) durch den Antikörper. Dagegen zeigten 30 Patienten (73%) CK-20-Expression in allen Zellschichten (anomale Markierung) (4). 3 von 4 metastatischen gastrischen Tumoren wurden durch den Antikörper (5) markiert.

Eine konzentrierte Immunfärbung mit dem Antikörper (weniger als 10% markierte Zellen) wurde bei 9 von 65 Lungentumoren, 1 von 20 Brusttumoren und 2 von 11 Tumoren des Endometriums beobachtet. 1 von 19 Nieren-Klärzellkarzinomen wurde in 10-50% der Zellen (3) markiert. Keines der 10 primären Eierstockkarzinome und keines der 5 Mesotheliome wurde durch den Antikörper (5) markiert.

References/ Références/ Literatur

- Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. Am J Pathol 1992; 140:427-47.
- Moll R. Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. In: Herrmann, Harris, editors. Subcellular biochemistry. Volume 31, New York: Plenum Press; 1998. p. 205-62.
- Savera AT, Torres FX, Linden MD, Bacchi CE, Gown AM, Zarbo RJ. Primary versus metastatic pulmonary adenocarcinoma. An immunohistochemical study using villin and cytokeratins 7 and 20. Appl Immunohistochem 1996; 4:86-94.
- Hamden P, Mahmood N, Southgate J. Expression of cytokeratin 20 redefines urothelial papillomas of the bladder. Lancet 1999; 353:974-77.
- Wauters CCAP, Smedts F, Gerrits LGM, Bosman FT, Ramaekers FCS. Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. Hum Pathol 1995; 26:852-55.
- Moll R, Schiller DL, Franke WW. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. J Cell Biol 1990; 111:567-80.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982; 31:11-24.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum		Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung		

Revision 2017.04

SSIR777CEEFG_01 p. 4/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

EK 5. Ki67 DATASHEET



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Ki-67 Antigen
Clone MIB-1
Ready-to-Use
(Link)

Code IR626

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Ready-to-Use (Link), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Autostainer Link instruments. This antibody is useful for the identification of the Ki-67 antigen in normal and neoplastic cells (1). Differential classification of tumors is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.
Summary and explanation	The Ki-67 antigen is a nuclear protein, which is defined by its reactivity with monoclonal antibody from the Ki-67 clone (2). Two isoforms of 345 and 395 kDa have been identified (3). The Ki-67 antigen is preferentially expressed during all active phases of the cell cycle (G₁, S, G₂ and M-phases), but it is absent in resting cells (G₀-phase) (2). During interphase, the antigen can be exclusively detected within the nucleus, whereas in mitosis most of the protein is relocated to the surface of the chromosomes. The antigen is rapidly degraded as the cell enters the non-proliferative state (4), and there appears to be no expression of Ki-67 during DNA repair processes (5). Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure; Materials Required, Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Troubleshooting; Interpretation of Staining; General Limitations.
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide. <u>Clone:</u> MIB-1 (6). <u>Iso-type:</u> IgG1, kappa.
Immunogen	Human recombinant peptide corresponding to a 1002 bp Ki-67 cDNA fragment (6).
Specificity	In Western blotting of lysates of the multiple myeloma cell line, IM-9, the MIB-1 antibody labels bands of 345 and 395 kDa, identical to the bands labeled by the original Ki-67 antibody. Furthermore, Western blotting and competitive binding experiments clearly demonstrate that MIB-1, like the original Ki-67 antibody, reacts with an epitope encoded by a 66 bp repetitive element in the Ki-67 gene. In IHC, the MIB-1 and the Ki-67 antibodies provide identical staining patterns on serial tonsillar frozen sections (6). The MIB-1 antibody recognizes native Ki-67 antigen and recombinant fragments of the Ki-67 molecule (6).
Precautions	1. For in vitro diagnostic use. 2. For professional users. 3. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2–8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation	The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. <u>Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER)</u> is required using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005). <u>Paraffin-embedded sections:</u> Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method. <u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using an aqueous or a permanent mounting method. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.
Staining procedure	The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH, (Link) (Code K8000), replacing the High pH Target Retrieval Solution from this kit with EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code K8005). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the used Autostainer platform, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008).

DK-2600-01-01-01-01-01

SSIR626CEEFG_02/ p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Staining interpretation

Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code IR750).

Cells labeled by the antibody display a nuclear staining pattern except in mitotic cells, where the chromosomes and the cytoplasm are labeled.

Performance characteristics

Normal tissues: Mucosal neck cells and deep crypt cells in small intestine and colon as well as germinal centre cells of Peyer's patches are positive with the antibody. Surface epithelium cells and other mucosal cells, e.g. Paneth cells and cells of submucosal connective tissue are negative. Muscle cells, are also negative, with the exception of a few positive cells in smooth muscles. Kidney, liver, pancreas and brain are negative (1). In tonsil, germinal centre B cells of the dark zone show a moderate to strong staining reaction, whereas germinal centre B cells of the light zone show a weak to moderate staining reaction (8).

Abnormal tissues: Membranous/cytoplasmic staining was reported in a study of 322 invasive ductal breast carcinomas (7). 24/24 prostate carcinomas were labelled by the antibody (9).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, Ready-to-Use (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Autostainer Link. Cet anticorps est utile pour l'identification de l'antigène Ki-67 dans les cellules saines et néoplasiques (1). La classification différentielle des tumeurs est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochemiques non immunologiques.

Résumé et explication

L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire, qui est définie par sa réactivité avec l'anticorps monoclonal provenant du clone Ki-67 (2). Deux isoformes de 345 et 395 kDa ont été identifiées (3). L'antigène Ki-67 est préférentiellement exprimé pendant toutes les phases actives du cycle cellulaire (phases G₁, S, G₂ et M) mais est absent des cellules au repos (phase G₀) (2). Pendant l'interphase, l'antigène peut être exclusivement détecté à l'intérieur du noyau, alors que pendant la mitose, la plupart de la protéine est relocalisée à la surface des chromosomes. L'antigène est rapidement dégradé lorsque la cellule entre en phase de non-prolifération (4) et il ne semble y avoir aucune expression de Ki-67 pendant les processus de réparation de l'ADN (5).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : MIB-1 (6) **Isotype :** IgG1, kappa.

Immunogène

Peptide humain recombinant correspondant à un fragment d'ADNc de Ki-67 de 1 002 pb (6).

Spécificité

Lors d'un Western blot de lysats de la lignée cellulaire de myélome multiple IM-9, l'anticorps MIB-1 marque les mêmes bandes de 345 kDa et 395 kDa, que celles marquées par l'anticorps Ki-67 d'origine. De plus, un Western blot et des expériences de liaison par compétition démontrent clairement que le MIB-1, tout comme l'anticorps Ki-67 d'origine, interagit avec un épitope codé par un élément répétitif de 66 pb dans le gène Ki-67.

En IHC, les anticorps MIB-1 et Ki-67 donnent des motifs de coloration identiques sur des séries de coupes congelées d'amygdale (6). L'anticorps MIB-1 reconnaît l'antigène natif Ki-67 et les fragments recombinants de la molécule Ki-67 (6).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision FLEX, Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005).

Coupes incluses en paraffine : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation des échantillons pour Dako PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.

Coupes déparaffinées : Le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine, déjà décrite. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).

Procédure de coloration

Le système de visualisation recommandé est EnVision™ FLEX, High pH, (Link) (réf. K8000), en remplaçant la solution High pH Target Retrieval Solution de ce kit par la solution EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. K8005). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est le suivant : 1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. Se reporter au Guide d'utilisation de l'Autostainer Link correspondant pour plus de détails sur

SSIR626CEFG_02/ p. 2/4

Während der Gewebepreparierung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision™ FLEX, High pH, (Link) (Code-Nr. K8000), welches die High pH Target Retrieval Solution dieses Systems durch EnVision FLEX Target Retrieval Solution, **Low pH** (50x) (Code-Nr. K8005) ersetzt. Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Das empfohlene Reagenzvolumen beträgt 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf der verwendeten Autostainer-Plattform nicht verfügbar sind, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code-Nr. K8008) ausgeführt werden.

Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Mandelgewebe enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (Code-Nr. IR750).

Auswertung der Färbung

Mit Ausnahme von mitotischen Zellen, wo die Chromosomen und das Zytoplasma markiert werden, weisen mit dem Antikörper markierte Zellen ein nukleares Färbemuster auf.

Leistungseigenschaften

Normalgewebe: Schleimhautnebenzellen und tiefe Kryptenzellen des Dün- und Dickdarms sowie Zellen des Keimzentrums von Peyer-Flecken reagieren positiv mit dem Antikörper. Oberflächenepithelzellen und andere Schleimhautzellen, wie z. B. Paneth-Zellen und Bindegewebszellen unter der Mukosa, reagieren negativ. Muskelzellen reagieren ebenfalls negativ, mit Ausnahme einiger positiver Zellen in der glatten Muskulatur. Niere, Leber, Pankreas und Gehirn reagieren negativ (1). In den Mandeln zeigen B-Zellen aus der dunklen Zone des Keimzentrums eine mäßige bis starke Färbereaktion, während B-Zellen aus der hellen Zone des Keimzentrums eine schwache bis mäßige Färbereaktion zeigen (8).

Anormales Gewebe: In einer Studie von 322 invasiven dukalen Brustkarzinomen wurden Membran- und Zytoplasmafärbungen berichtet (7). 24/24 Prostatakarzinomen wurden durch den Antikörper markiert (9).

References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol 1992; 168:357-63.
- Gerdas J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 1984;133:1710-5.
- Gerdas J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol 1991; 138:867-73.
- Scholzen T, Gerdas J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [review]. J Cell Physiol 2000; 182:311-22.
- Key G, Kubbutat MH, Gerdas J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. J Immunol Methods 1994; 177:113-7.
- Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad H-D, et al. New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. Lab Invest 1993; 68:629-36.
- Faratian D, Munro A, Twelves C, Bartlett JMS. Membranous and cytoplasmic staining of Ki67 is associated with HER2 and ER status in invasive breast carcinoma. Histopathology 2009;54:254-257.
- Dako in-house test. Report D330066
- Claudio PP, Zamparelli A, Garcia FU, Claudio L, Ammirati G, Farina A, et al. Expression of cell-cycle-regulated proteins pRb2/p130, p107, p27kip1, p53, mdm-2, and Ki-67 (MIB-1) in prostatic gland adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2002; 8:1808-15.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		Contains sufficient for <n> tests Contenance suffisante pour <n> tests Ausreichend für <n> Tests		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		

Revision/ Révision/ Revision 2018.02

SSIR626CEEF02/ p. 4/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

EK 6. P53 DATASHEET



FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
p53 Protein
Clone DO-7
Ready-to-use
(Link)

Code IR616

ENGLISH

Intended use	For in vitro diagnostic use. FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use, (Link), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Autostainer Link instruments. This antibody labels wild-type and mutant-type p53 protein and is useful for investigation of p53 accumulation in human neoplasias (1, 2). Differential classification of tumors is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.
Summary and explanation	p53 is a nuclear phosphoprotein with a molecular mass of 53 kDa. Wild-type p53 protein is present in a wide variety of normal cells, but the protein has a very short half-life and thus is present in only minute amounts (1), generally below the detection level of immunohistochemical methods (3). Somatic mutation of the p53 gene is a very frequent event in the development of human neoplasia, and because mutant p53 proteins often are much more stable than wild-type p53 protein, the mutant p53 protein accumulates to a high level (1). As examples, p53 protein accumulation was observed in 76% of 212 human malignant lesions, including breast, colon and stomach carcinomas, melanoma, embryonal carcinoma of the testis, transitional carcinoma of the urinary bladder, uterine carcinoma and soft tissue sarcomas (4). Wild-type p53 protein functions as a transcription factor, i.e. as a modulator which can turn crucial genes either on or off. It also inhibits DNA replication and is a check-point control molecule for progression of the cell cycle. Furthermore, p53 protein is involved in the regulation of apoptosis. In transfection assays, wild-type p53 behaves as a tumor suppressor, while mutant p53 behaves as a dominant transforming oncogene (1). Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure; Materials Required; Not Supplied; Storage; Specimen Preparation; Staining Procedure; Quality Control; Troubleshooting; Interpretation of Staining; General Limitations.
Reagent provided	Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide. Clone: DO-7 (1) Isotype: IgG2b, kappa.
Immunogen	Recombinant human wild-type p53 protein (1).
Specificity	In Western blotting of lysate of the A431 human vulvar carcinoma cell line, the antibody labels a 53 kDa band, corresponding to the mutant type p53, which is expressed by A431. The epitope recognized by the antibody is located between the N-terminal amino acids 1 and 45 and possibly between amino acids 37 and 45 of the human p53 protein (1). SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between lysate of the BT474 breast cancer cell line and the antibody shows reaction with a 53 kDa protein corresponding to p53 (1). In IHC the antibody labels mutant-type p53 in the A431 cell line and wild-type p53 in the SVK14 cell line (SV40-transformed keratinocyte line) (1).
Precautions	1. For in vitro diagnostic use. 2. For professional users. 3. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. 5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. 6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation	The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm. Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting method. Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using an aqueous or a permanent mounting method. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.
Staining procedure	The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Link) (Code K8000). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the used Autostainer instrument, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature.

SSIR616CEEFG_01 p. 1/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8006). Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include colon and colon adenocarcinoma and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (Code IR750).

Staining interpretation Cells labeled by the antibody generally display nuclear staining, but cytoplasmic staining has been reported in some cases (5).

Performance characteristics **Normal tissues:** In normal and reactive mesothelium the antibody labeled 0/40 cases, and in 27 mesotheliomas, normal cells, e.g. fibroblasts and endothelial cells were negative (2). In colon, only the scattered benign basal epithelial cells show a weak to moderate nuclear staining reaction.

Abnormal tissues: In follicular lymphoma an increasing accumulation of p53 in centroblasts was observed with morphological progression resulting in 1/16 cases of grade I, 10/21 cases of grade II, and 6/6 cases of grade III being labeled (3). In mesotheliomas the antibody labeled 7/26 cases of epithelial type (1 to 25% labeled cells), 1/7 cases of mixed type (25 to 50% labeled cells), and 1/3 cases of mesenchymal type (more than 75% labeled cells) (2). The neoplastic cells in colon adenocarcinoma show a moderate to strong nuclear staining reaction.

FRANÇAIS

Utilisation prévue Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use, (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Autostainer Link. Cet anticorps marque la protéine p53 de types sauvage et mutant et facilite la recherche d'accumulation de p53 dans les néoplasies humaines (1, 2). La classification différentielle des tumeurs est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochemiques non immunologiques.

Résumé et explication La p53 est une phosphoprotéine nucléaire ayant une masse moléculaire de 53 kDa. La protéine p53 de type sauvage est présente dans un grand nombre de cellules saines, mais cette protéine a une demi-vie très courte et n'est donc présente qu'en faible teneur (1), généralement en deçà du seuil de détection des méthodes immunohistochemiques (3). La mutation somatique du gène p53 est un événement très fréquent dans le développement des néoplasies humaines et, du fait que les protéines p53 mutantes sont souvent beaucoup plus stables que la protéine p53 de type sauvage, la protéine p53 mutante s'accumule à un taux élevé (1). Par exemple, une accumulation de protéine p53 a été observée dans 76% des 212 lésions malignes humaines, notamment les carcinomes du sein, du colon et de l'estomac, le mélanome, le carcinome embryonnaire du testicule, le carcinome transitionnel de la vessie, le carcinome utérin et les sarcomes des tissus mous (4).

La protéine p53 de type sauvage agit comme facteur de transcription, c'est-à-dire comme modulateur qui peut soit activer, soit désactiver des gènes cruciaux. Elle inhibe également la réplication de l'ADN et est une molécule de contrôle des différentes étapes de la progression du cycle cellulaire. De plus, la protéine p53 est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Dans les essais de transfection, la p53 de type sauvage se comporte comme suppresseur tumoral, alors que la p53 mutante agit comme oncogène transformant dominant (1).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochemique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.

Réactif fourni Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : DO-7 (1). **Isotype :** IgG2b, kappa.

Immunogène Protéine p53 recombinante humaine de type sauvage (1).

Spécificité Dans les analyses par Western blot du lysat de lignée cellulaire de carcinome vulvaire humain A431, l'anticorps marque une bande de 53 kDa, correspondant à la p53 de type mutant, qui est exprimée par l'A431. L'épitope reconnu par l'anticorps est localisé entre les acides aminés 1 et 45 du N-terminal et éventuellement entre les acides aminés 37 et 45 de la protéine p53 humaine (1).

L'immunoblot PAGE en présence de SDS d'immunoprécipités formés entre le lysat de lignée cellulaire de cancer du sein BT474 et l'anticorps présente une réaction à une protéine de 53 kDa correspondant à la p53 (1).

En immunohistochimie, l'anticorps marque la p53 de type mutant dans la lignée cellulaire A431 et la p53 de type sauvage dans la lignée cellulaire SVK14 (lignée de kératinocytes transformés par SV40) (1).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN₃), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004).

Coupes incluses en paraffine : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation des échantillons pour Dako PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.

Coupes déparaffinées : Le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine, déjà décrite. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

SSIR616CEEFG_01 p. 2/4

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Gewebevorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link und nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Nach Durchführung des Färbeverfahrens müssen die Objektträger unter Verwendung eines geeigneten permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.

Während der Gewebeprevorbehandlung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, High pH (Link). (Code-Nr. K8000). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Das empfohlene Reagenzvolumen beträgt 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code-Nr. K8008) ausgeführt werden.

Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Dickdarm- und Dickdarm-Adenokarzinom enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe unter „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (Code-Nr. IR750).

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen in der Regel eine nukleäre Färbung auf, in einigen Fällen kann jedoch auch eine zytoplasmatische Färbung auftreten (5).

Normalgewebe: Bei normalem und reaktivem Mesothel markierte der Antikörper 0/40 Fällen. Bei 27 Mesotheliomen testeten die normalen Zellen, z. B. Fibroblasten und Endothelzellen, negativ (2). In Dickdarm weisen nur die verstreuten benignen Basalepithelzellen fokal eine schwache bis mäßige Färbereaktion auf.

Anormales Gewebe: Beim follikulären Lymphom wird mit morphologischer Progression eine zunehmende Akkumulation von p53 in Zentroblasten beobachtet, mit resultierender Zunahme der positiven Reaktion: 1/16 Fällen bei Grad I, 10/21 Fällen bei Grad II und 6/6 Fällen bei Grad III (3). Bei Mesotheliomen markierte der Antikörper 7/26 Fälle der epithelialen Form (1-25% markierte Zellen), 17 Fälle der Mischform (25-50% markierte Zellen) und 13 Fälle der mesenchymalen Form (über 75% markierte Zellen) (2). Die neoplastischen Zellen im Dickdarm-Adenokarzinom zeigten eine mäßige bis starke Färbereaktion.

1. Vojtěšek B, Bártěk J, Midgley CA, LaPond AP. An immunohistochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992; 151:237-44.
2. Ramael M, Lemmens G, Eerdekens C, Buysse C, Deblrier I, Jacobs W, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. *J Pathol* 1992; 168:371-5.
3. Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. *J Pathol* 1997; 182:307-10.
4. Bártěk J, Bártíková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Lukáš J, Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6:1699-703.
5. Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E, Sambaziotis D, Tsagarakis S. Immunocytochemical accumulation of p53 in corticotroph adenomas: Relationship with heat shock proteins and apoptosis. *Pituitary* 1998; 1:207-12.

Catalogue number Référence catalogue Katalognummer	2°C - 8°C Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	Use by Utiliser avant Verwendbar bis
In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Contains sufficient for <N> tests Contenu suffisant pour <N> tests Ausreichend für <N> Tests	Manufacturer Fabricant Hersteller
Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	Batch code Réf du lot Chargenbezeichnung	

Revision/ Révision/ Revision 2017.10