

MESANENİN NONİNVAZİV PAPİLLER ÜROTELYAL TUMÖRLERİNİN WHO/ISUP KONSENSUS SINIFLAMASINA GÖRE YENİDEN SINIFLANDIRILMASI VE ALTGRUPLARIN P53 VE Ki-67 EKSPRESYONLARI İLE KORELASYONU

Dr. Zehra GÜLÇİFTÇİ*, Dr. Ayşenur AKYILDIZ İĞDEM*, Dr. Pınar TUZLALI*, Dr. Ruhi SARI**, Dr. Can ARAT**, Dr. Nusret ERDOĞAN*

ÖZET: Amaç: 1998 WHO/ISUP Konsensus toplantısında, pTa evreli mesane ürotelial hücreli karsinomlar, 'noninvaziv papiller ürotelial neoplazm' başlığı altında toplanarak histomorfolojiye dayanan 4 altgrup oluşturulmuştur. Bu altgruplar arasında rekürrens ve progresyon tahmininde p53 ve Ki-67 overekspresyonun yararlı olabileceğini düşünülmüştür. **Materyel-Metod:** Bu çalışmada, 1995-1999 yılları arasında, Taksim Hastanesi patoloji laboratuvarında, papillom, grade I, II (Mostofi) ve stage pTa ürotelyal hücreli karsinom tanısı almış 50 olgu retrospektif olarak incelenmiş ve konsensüs sınıflamasına göre, 4 altgruba ayrılmıştır. İmmünohistokimyasal olarak altgrupların p53 ve Ki-67 overekspresyonlarının, prognoz ile korelasyonunun istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır. **Bulgular:** Laboratuvarımızda değerlendirilen mesane tümörlerinin yaklaşık %95.3'ünü ürotelyal hücreli karsinomlar oluşturmaktadır. İlk tanı sırasında hastaların %32.3'ü evre pTa ve papillom, grade I-II (Mostofi) ürotelyal hücreli karsinomludur. Olguların %14.58'i ürotelyal papillom (ÜP), %33'ü düşük malign potansiyelli papiller ürotelial neoplazm (LMP-PÜN), %29.16'sı düşük-gradeli papiller ürotelyal karsinom (LG-PÜK) ve %22.91'i yüksek gradeli papiller ürotelial karsinom (HG-PÜK) olarak tespit edildi. P53 ve Ki-67 ekspresyonları ortalama değerleri sırasıyla ÜP'da 0.03 ve 0.0380, LMP-PÜN grubunda, 0.0660 ve 0.080; LG-PÜK grubunda, 0.1999 ve 0.1969; HG-PÜK grubunda 0.3517 ve 0.3010 olarak bulundu. **Tartışma:** Evre pTa'lı hastaların %90'dan fazlasında benign formda mesane neoplazmları mevcuttur. Gerçek malign tümöre sahip hasta grubu azdır. Ölümüne sebebiyet verebilecek yüksek rekürrens ve progresyon potansiyeli mevcut bu grubu belirlemenin önemi açıktır. **Sonuç:** WHO/ISUP Konsensusunun getirdiği bu yeni yaklaşım, noninvaziv mesane tümörlerinin prognostik tahmininde, klinik verilerle uyumlu bulunmuştur. Bu morfolojik yaklaşım immünohistokimyasal çalışma ile tamamlanıp, p53(p=0.003) ve Ki-67(p=0.005) overekspresyon değerleri ile istatistiksel olarak da doğrulanmıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Mesane ürotelyal hücreli karsinom, noninvaziv papiller neoplazm, WHO/ISUP Konsensus sınıflama, p53, Ki-67, prognoz.

SUMMARY: RECLASSIFICATION OF NONINVASIVE PAPILLARY UROTHELIAL NEOPLASMS ACCORDING TO THE WHO/ISUP CONSENSUS CLASSIFICATION AND EVALUATION OF p53 AND Ki 67 OVEREXPRESSION IN THESE SUBGROUPS. **Objective:** In 1998 WHO/ISUP consensus meeting, stage pTa urothelial cell neoplasms of the bladder were classified under the term "non-invasive papillary urothelial neoplasms" and four histomorphologic subgroups were defined. This study evaluate whether p53 and Ki-67 overexpression in these subgroups may be of value in estimating recurrences and prognosis. **Materials and Methods:** A retrospective review was made of 50 cases who were diagnosed papilloma, grade-II (Mostofi) and stage pTa urothelial cell carcinoma between 1995-99 in Taksim State Hospital. All cases were classified into four subgroups according to the consensus. Samples were stained immunohistochemically for p53 and Ki-67 and correlation was sought between overexpression of p53 and Ki-67 and prognosis. **Results:** 95% of the bladder carcinomas diagnosed in our laboratory were of urothelial cell origin and 32% of these were in stage pTa and papilloma grade I-II (Mostofi). 15% of the cases were urothelial papilloma (UP), 33% papillary urothelial neoplasm with low malignant potential (PUN-LMP), 29% low-grade papillary urothelial carcinoma (LG-PUC) and 23% high-grade papillary urothelial carcinoma (HG-PUC). Mean expression levels of p53 and Ki-67 were 0.03 and 0.0380 in urothelial papilloma, 0.0660 and 0.080 in papillary urothelial neoplasm with low malignant potential, 0.1999 and 0.1969 in low-grade and 0.3517 and 0.3010 in high-grade papillary urothelial carcinoma, respectively. **Conclusion:** The study results were consistent with WHO/ISUP consensus classification with respect to recurrence and progression of papillary urothelial neoplasms, with p53 and Ki-67 overexpression levels being compatible with the diagnosis of the subgroups.

KEY WORDS: Urothelial cell neoplasms, non-invasive papillary urothelial neoplasms, 1998 WHO/ISUP consensus meeting, p53, Ki-67, prognosis.

GİRİŞ

Mesane ürotelyal hücreli neoplazmları, kendilerine özgü biyolojik özellikleri ve farklı klinik sonuçları olan geniş spektrumlu tümörleri kapsamaktadır. Histolojik bulgular üzerine kurulu pek çok sınıflandırmanın varlığı, klinik sonucun tahmininin zorluğunu yansıtmaktadır (2). Ürotelyal hücreli tümörlerin sınıflandırılmasında uzun süredir tartışılan noktalardan birisi de noninvaziv düşük grade papiller lezyonların yapısıdır. (3) Bazı tümörler asla invazyon ve metastaz göstermezken, bir kısmı çok çabuk progresyon gösterirler (4). Morfolojik sınıflandırmanın hem kişi hem de kişiler arası büyük farklılıklar gösterdiği bilinirken, düşük grade papiller lezyonların biyolojik potansiyelini belirlemek, patolojik sınıflandırma ve tanımlama konusundaki standardizasyon eksikliği nedeniyle oldukça zordur (3,5). Bu yüzden patolojiler ürotelyal hücreli neoplazmların sınıflandırılmasının değişmesi konusunda fikir birliğine varmışlardır.

İşte bu noktada 1998 yılında Uluslararası Ürolojik Pato-

loglar Birliği (ISUP) tarafından düzenlenen toplantı sonucu, mesane lezyonlarının terminolojisi ve ürotelyal hücreli karsinomların derecelendirilmesi konusunda yeni bir konsensus oluşturulmuş ve sonuçta, düşük gradeli papiller ürotelyal lezyonlar için isim ve tanısal kriterler konusunda bir standart belirlenmiştir (6). WHO/ISUP sınıflama ile yüzeysel mesane tümörü kavramı tümüyle ortadan kalkmıştır. Bu sınıflama pTa ve pT1 tümörlerin progresyon oranları sırasıyla %4 ve %30 olması nedeniyle, ikisini aynı grup içinde değerlendirmemiştir. pTa tümörleri, "noninvaziv papiller ürotelyal neoplazm" başlığı altında toplayarak histomorfolojiye dayanan 4 altgrup oluşturmuştur (7).

Mesane ürotelyal hücreli karsinomlarının, ölümüne sebebiyet verebilecek yüksek rekürrens ve invaziv hastalığa progresyon potansiyeli mevcuttur. Bu durumda hangi grup hastanın rekürrens ve progresyon açısından düşük risk taşıdığını belirlemenin önemi açıktır (6). Morfolojik sınıflamalara ek olarak hastalık sonuçlarıyla uyum gösterecek objektif markerlar gerekir mi? Bu sorulara cevap arayışı içinde noninvaziv papiller ürotelyal neoplazmları, WHO/ISUP sınıflaması kriterlerine dayanarak, morfolojik olarak altgruplamanın progresyon tahmininde tek başına yetmediği sonucuna varıldı. Devamında da, yeni sınıflamaya

* Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü

** Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Servisi

göre altgruplamanın, biyolojik aktivitenin objektif göstergeleri olarak kullanılabilecek moleküler markerlar p53 ve Ki-67 ile korelasyonunun, prognostik önemini görmek amacıyla çalışmamızı belirledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Vaka Grubunun Seçilmesi: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarında Ocak 1995 ile Aralık 1999 yılları arasında, primer mesane kanseri tanısı almış olguların patoloji rapor kayıtları gözden geçirildi. Bunlardan skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, indifferansiyel karsinom, malign mezenkimal tümör tanısı alan olgular çalışma dışı bırakılarak ürotelyal hücreli karsinom (ÜHK) tanısı alan toplam 152 cerrahi materyel saptandı.

Bu vakaların arasından farklı histolojik grade ve patolojik evredeki yaklaşık 140 tanesine ait histolojik preparatlar arşivden çıkarılarak yeniden incelendi. Olguların Hematoksilan+ Eozin (H+E) ile boyanmış kesitlerinin tümü ışık mikroskopunda incelendi. Histolojik grade, Mostofi Grade'leme sistemi kullanılarak, evreleme ise AJCC/UICC'nin TNM sistemi kullanılarak belirlendi. Bu inceleme sonucuna göre evre pTa (AJCC/UICC-1997) ve grade I-II (Mostofi) olan 52 (%34,21) vaka seçildi. Seçilen vakaların içinde, çok seyrek olarak saptanabilen pTa-grade III grubu vakalar yer almamaktadır. Elli iki vakanın içinden 2 tanesinin arşiv blokları immünhistokimyasal inceleme için uygun olmadığından çalışma dışı bırakıldı. Bu çalışmaya nüks eden pTa ÜHK'lu vaka grubunu oluşturan 17 hastanın ilk başvurularına ait örnekler alındı. Bizim kayıtlarımıza göre nüks etmeyen vaka grubunu oluşturan 23 hastanın klinik izlemelerine göre de nüks etmediği Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji kliniği arşiv kayıtlarından doğrulanırken, bu gruptaki hastaların izlem süresinin en az 2 yıl olmasına dikkat edildi. Çalışma grubu kapsamına aldığımız pTa grubu 50 hasta, mesane tümörü rezeksiyonlarını (TUR-MT) ve takiplerini hastanemizde yaptırın ve en az 6 aylık takibi olan hastalardır. Hastaların 47'si erkek (%94), 3'ü (%6) kadındır (E/K:15,7/1). Yaş ortalaması 59.98 (35-75) dir. Hastalarımız ortalama (6 ay-58 ay) 26,8 ay izlendi.

Seçilen 50 olgu, 1998 WHO/ISUP konsensus sınıflamasına göre H+E preparatları incelenerek histomorfolojik olarak 4 altgruba ayrıldı. "Inverted papillom" olarak tanımlanan 2 vakaya uygulan p53 ve Ki-67 immünreaktivite değerlerinin yüksekliliği dolayısıyla istatistiksel sonuçları yanlış pozitif olarak etkilediği düşünüldüğü için çalışma dışı bırakıldı. İstatistiksel analizler toplam 48 olgu üzerinde yapıldı. Makroskopik özellikler arşiv raporlarına dayanılarak değerlendirildi. Histopatolojik incelemeler, %10 formalin fikse parafin bloklardan hazırlanmış 3-5µm'lik Hematoksilan-Eozin boyalı arşiv preparatları üzerinde yapıldı. Tümörü en iyi örnekleyen ve nekroz içermeyen birer adet H+E boyalı lamalara ait parafin bloklar, immünhistokimyasal olarak p53 ve Ki-67 ile boyanmak üzere seçildi.

İmmünhistokimyasal Boyama İşlemleri: Seçilen parafin bloklardan elde edilen kesitlere primer antikörler p53 (Neomarkers Fremont, CA, USA-Cat No: MS-758-R7) ile Ki-67 (Neomarkers Fremont, CA, USA Cat No: MS-1006-R7) sekonder antikor olarak Biotinylated Goat Anti-Mouse (Lab Vision Corporation, CA, USA-Cat. No: TM-060-HL) uygulandı. İşaretleyici olarak Streptavidin Peroxidase (Lab Vision Corporation, Westinghouse, CA, USA-Cat. No:TM-060-HL) kullanıldı. Çalışmamızda pozitif kontrol için daha önce p53 ve Ki-67 immünreaktivitesi saptanmış olan yüksek grade'li meme tümör dokusu kullanılmıştır.

İmmünreaktivitenin Değerlendirilmesi: Neoplastik popülasyonda immünreaktivitenin en yoğun olduğu alanlar x4 ve x10 objektifler kullanılarak belirlendi. Sayımın yapılacağı alanlar seçilirken bazal tabaka hücrelerini yoğun olarak içeren, tanjansiyel kesilmiş tümöral alanlardan kaçınıldı. Tümöral hücre tabakalarının tam katını içerecek şekilde alanların seçilmesine dikkat edildi. Daha sonra x40 objektif kullanılarak farklı alanlarda bir büyük büyütme alanındaki tüm neoplastik hücreler ve immünreaktivite gösteren neoplastik hücreler sayılarak toplam en az 1000 tümör hücresindeki pozitif reaksiyon veren hücreler saptandı. Her iki antikor için de neoplastik karakterdeki hücrelerin nükleuslarındaki pozitivite değerlendirilirken, boyanma yoğunluğu göz önüne alınmadı. Böylece her bir vakada p53 ve Ki-67 immünreaktivite indeksi, 100 hücrede pozitif boyanmış hücre sayısı olarak hesaplandı. Literatürde yapılan çalışmalarda p53 immünreaktivite indeksi için bulunan ve en sık kullanılan eşik değer %22 alınarak, p53 immünreaktivite indeksi <%22 olan vakalar negatif (overekspresyon yok), >%22 olan vakalar pozitif (overekspresyon var) olarak değerlendirildi (8). Benzer çalışmalarda Ki-67 immünreaktivite indeksi için en uygun eşik değeri %10 alındığı görüldü. Ki-67 immünreaktivite indeksi <%10 olan vakalar negatif, >%10 olan vakalar pozitif olarak değerlendirildi (8).

İstatistiksel Değerlendirmeler: İstatistiksel değerlendirmelerin tümü Windows 98 altında çalışan SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 9,0 kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak p53 ve Ki-67 immünreaktivite indeksleri ile WHO/ISUP histolojik gradelemesine göre altgruplar arasındaki ilişkiler "Independent Samples T Testi" ile ve nüks ve progresyonla olan ilişkiler "Mann Whitney U Testi" yardımıyla araştırıldı. p53 ve Ki-67 immünreaktiviteleri arasındaki istatistiksel ilişki "Pearson korelasyon katsayısı testi" ile araştırıldı.

BULGULAR

Epidemiyolojik ve Histopatolojik Bulgular: Çalışma kapsamındaki 48 olgudan en genci 35 en yaşlısı 77 yaşında olup, yaş ortalaması 60.04±10.14'dir. 48 olgudan sadece 3'ü (%6) kadındır. Hastaların 17 (%35.4) tanesi nüks, bunların da 3 tanesi (%17.6) progresyon gösteren hastalardır. İnceleme, vakaların hepsinde transüretal mesane rezeksiyonu (TUR) materyelleri üzerinde yapılmıştır. pTa olgularımızı, 1998 WHO/ISUP konsensus sınıflamasının "noninvaziv papiller neoplazmlar" için geçerli kriterlerine göre yeniden değerlendirerek 4 altgruba ayırdık. Bu sisteme göre olgularımızın altgruplara dağılımı şu şekildedir. Kırk sekiz olgumuzun, 7 tanesi (%14.58) ÜP, 16 tanesi (%33.33) LMP-PÜN, 14 tanesi (% 29.16) LG-PÜK, 11 tanesi (%22.91) HG-PÜK olarak tanımlanmıştır. Hastaların ortalama yaşlarının subgruplara göre dağılımı şu şekildedir. Ürotelyal papillomlu olguların yaş ortalaması 58.42'dir. Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal tümörlü altgrupumuzda en genci 35 en yaşlısı 77 yaşında olup yaş ortalaması 60.0'dir. Düşük gradeli papiller ürotelyal karsinom'lu olguların yaş ortalaması 61.71'dir. Yüksek gradeli papiller ürotelyal karsinom'lu olguların yaş ortalaması 59.0'dir.

Nüks ve progresyon gösteren olgularımızın dağılımı şu şekildedir. Ürotelyal papillom olarak tanımlanan 7 olgu içinde nüks ve progresyon görülmedi. Düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal tümör olarak tanımlanan 16 olgu içinde nüks sayısı 1 (%6.25), iken progresyon gösteren olgu yoktur. Düşük gradeli papiller ürotelyal karsinom olarak tanımlanan altgrupumuzdaki 14 olgu içinde, nüks sayısı 8 (%57.14),

progresyon gösteren olgu sayısı 1 (%7.14)'dir. Yüksek grade papiller ürotelyal karsinom, olarak tanımlanan altgrupumuzdaki 11 olgu içinde nüks sayısı 8 (72.72), progresyon gösteren olgu sayısı 2 (%18.18)'dir. Nüks gösteren olguların dağılımı açısından altgruplara bakıldığında özellikle ÜP ve LMP-PÜN subgruplarını içeren düşük gradeli tümörler ile LG-PÜK ve HG-PÜK altgruplarından oluşan karsinom grubu arasında belirgin fark olduğu görüldü. Nüks eden olguların büyük çoğunluğu LG-PÜK ve HG-PÜK grubunda yer almaktadır.

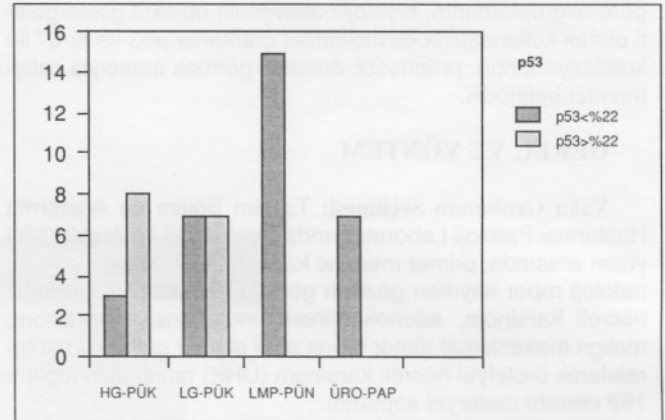
ÜP ve LMP-PÜN subgruplarındaki nüks eden ve LG-PÜK ve HG-PÜK altgruplarındaki nüks eden olguların korelasyonuna bakıldığında, istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki bulunmuştur ($r:0.657$, $p<0.0001$). Nüks ile her bir morfolojik altgrup arasında istatistiki olarak ileri derece anlamlı ilişki bulunmuştur ($r:0.611$, $p<0.0001$).

İmmünohistokimyasal bulgular:

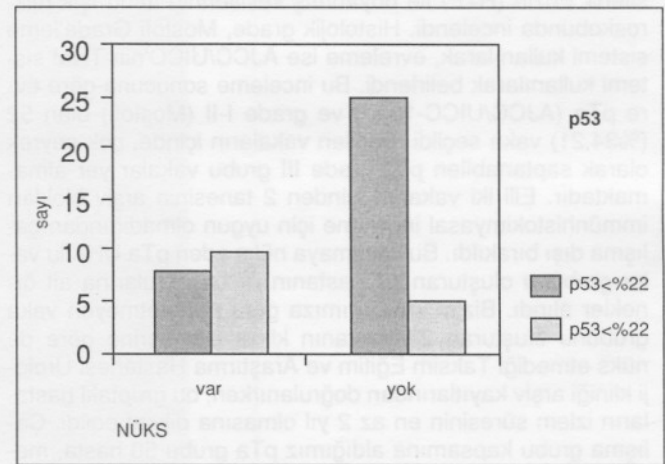
p53 İmmünreaktivitesi: p53 immünreaktivite indeksinin %0 ile %68.67 arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi. p53 immünreaktivite indeksleri için %22 eşik değeri olarak alındığında, olguların 15 tanesi (%31.25) p53 immünreaktivitesi için (+), 33 tanesi (%68.75) p53 immünreaktivitesi için (-)'tir. Eşik değere (%22) göre p53 overekspresyonu olan ve olmayan olguların subgruplara göre dağılımı şu şekildedir. ÜP sub grubunda 7 olgunun tamamı (%100) p53 overekspresyonu için (-)'tir. LMP-PÜN sub grubunda 16 olgunun tamamı (%100) p53 overekspresyonu için (-)'tir. LG-PÜK sub grubunda 14 olgunun 7 tanesi (%50), p53 overekspresyonu için (+)'tir. HG-PÜK sub grubunda 11 olgunun 8 tanesi (%72.72), p53 overekspresyonu için (+)'tir. Eşik değere göre, subgruplar ile p53 overekspresyonu arasında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki vardır. ($p<0.0001$) Eşik değere (%22) göre p53 overekspresyonu olan ve olmayan olguların alt gruplara göre dağılımı Tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmektedir.

p53 immünreaktivitesi ve nüks eden olguların altgruplara göre dağılımı: p53 immünreaktivitesi ile nüks ve progresyon arasındaki ilişkiler araştırılırken sadece nüks eden olguların p53 ile korelasyonunun istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır. Progrese eden olguların sayısı çok az olduğundan istatistiksel çalışmaların kapsamı dışında bırakılmıştır. Eşik değere göre p53 overekspresyonunun nüks göstermeleri açısından olgulardaki dağılımı Tablo 2'de ve Şekil 2'te gösterilmiştir.

Eşik değeri %22 olarak alındığında p53 overekspresyonu ile nüks eden olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı iliş-



Şekil 1: Eşik değeri %22 olarak alındığında p53 overekspresyonunun subgruplara göre dağılımı



Şekil 2: p53 overekspresyonunun nüks eden ve etmeyen olgulardaki dağılımı

ki vardır ($p=0.004$). ÜP ve LMP-PÜN altgruplarını içeren düşük gradeli tümör grubundaki nüks eden olgular ile LG-PÜK ve HG-PÜK altgruplarını içeren karsinom grubundaki nüks eden olgular ile p53 immün reaktivitesinin korelasyonuna bakıldığında, istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki bulunmuştur ($r:0.620$, $p<0.0001$).

Ki-67 İmmünreaktivitesi: İmmünohistokimyasal olarak Ki-67 antikoruna (Klon MIB 1) ile immünreaktivite, neoplastik hücrelerin nükleuslarında izlendi. Değerlendirme yapılırken boyanma yoğunluğu göz önüne alınmadı. Neoplastik hücre nükleuslarında boyanma kuvvetli olduğu zaman homojen, daha zayıf olduğunda ise granüler bir boyanma paterni gözlemlendi. Değerlendirme yapılırken her iki şekilde boyanan hücreler de pozitif olarak kabul edildi. Ki-67 immünreaktivite indeksinin %0 ile %68.7 arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi. Ki-67 immünreaktivite indeksleri için %10 eşik değeri olarak alındığında, olguların 28 tanesi (%58.33) Ki-67 immünreaktivitesi için (+), 20 tanesi (%41.66) Ki-67 immünreaktivitesi için (-)'tir. Eşik değere (%10) göre Ki-67 overekspresyonu olan ve olmayan olguların altgruplara göre dağılımı şu şekildedir. ÜP alt grubunda 7 olgunun 1 tanesi (%14.28) Ki-67 overekspresyonu için (+)'tir. LMP-PÜN alt grubunda 16 olgunun 2 tanesi (%12.5) Ki-67 overekspresyonu için (+)'tir. LG-PÜK alt grubunda 14 olgunun 13 tanesi (%92.8) Ki-67 overekspresyonu için (+)'tir. HG-PÜK alt grubunda 11 olgunun 10 tanesi (%90.9), Ki-67 overekspresyonu için (+)'tir.

TABLO 1: EŞİK DEĞER %22 ALINDIĞINDA, p53 OVEREKSPRESYONUNUN SUBGRUPLARA GÖRE DAĞILIMI

	ÜP	LMP-PÜN	LG-PÜK	HG-PÜK
p53 (+)	0	0	7	8
p53 (-)	7	16	7	3
Toplam	7	16	14	11

TABLO 2: p53 OVEREKSPRESYONUNUN NÜKS EDEN VE ETMEYEN OLGULARDAKİ DAĞILIMI

Olgular	p 53 (+)	p 53 (-)
Nüks eden (17-%35.41)	9 (%52.94)	8 (%47.05)
Nüks etmeyen (31-%64.58)	5 (%16.12)	26 (%83.87)

TABLO 3: EŞİK DEĞER %10 OLARAK ALINDIĞINDA, Ki-67 OVEREKSPRESYONUNUN SUBGRUPLARA GÖRE DAĞILIMI

	ÜP	LMP-PÜN	LG-PÜK	HG-PÜK
Ki-67 (+)	1	2	13	10
Ki-67 (-)	6	14	1	1
Toplam	7	16	14	11

TABLO 4: EŞİK DEĞER %10 OLARAK ALINDIĞINDA Ki-67 OVEREKSPRESYONUNUN NÜKS EDEN VE ETMEYEN OLGULARDAKİ DAĞILIMI

Olgular	Ki-67 (+)	Ki-67 (-)
Nüks eden (17-%35.41)	15 (%88.23)	2 (11.76)
Nüks etmeyen (31-%64.58)	13 (%41.93)	26 (%83.87)

Eşik değere (%10) göre Ki-67 overekspresyonu olan ve olmayan olguların altgruplara göre dağılımı Tablo 3 ve Şekil 3'de gösterilmektedir.

Eşik değeri %10'a göre, altgruplar ile Ki-67 overekspresyonu arasında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki vardır ($p<0.0001$).

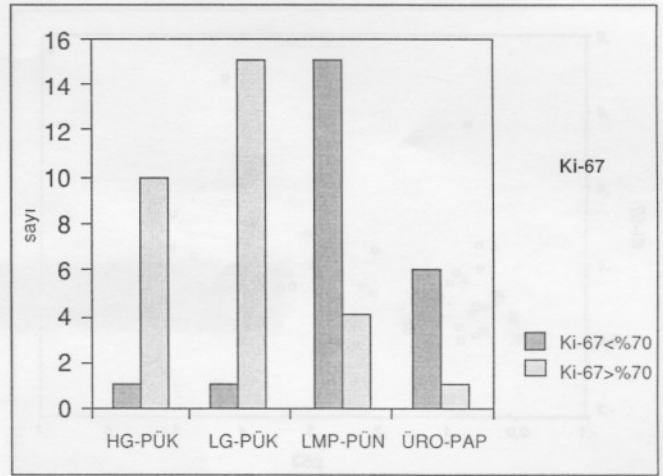
Ki-67 immünreaktivitesi ve nüks eden olguların altgruplara göre dağılımı: Ki-67 immünreaktivitesi ile nüks ve progresyon arasındaki ilişkiler araştırılırken sadece nüks eden olguların Ki-67 ile korelasyonunun istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır. Progresyon gösteren olguların sayısı çok az olduğundan istatistiksel çalışmaların kapsamı dışında bırakılmıştır. Eşik değere göre Ki-67 immünpozitivitesinin nüks göstermeleri açısından olgulardaki dağılımı Tablo 4'de ve Şekil 4'de gösterilmiştir.

Eşik değer %10 olarak alındığında, Ki-67 overekspresyonu ile nüks eden olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ($p=0.001$). Ki-67 immünreaktivitesi ile nüks eden olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır ($r:0.381$, $p=0.007$). Ki-67 immünreaktivitesi ile nüks eden olguların subgruplardaki dağılımının korelasyonuna bakıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($r:0.381$, $p<0.0001$).

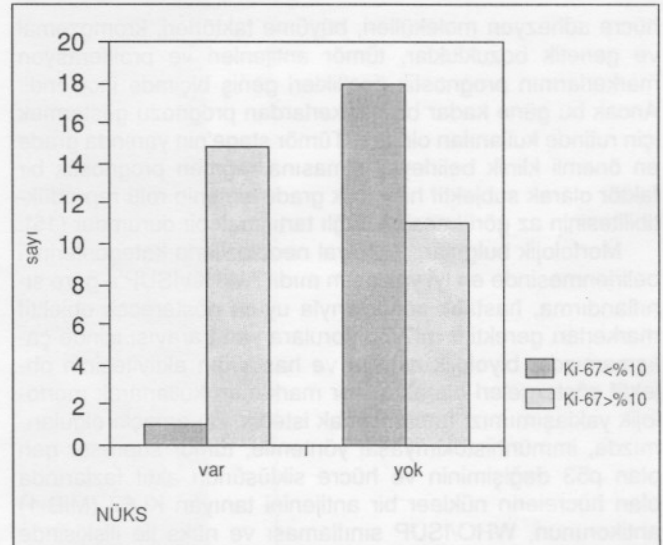
P53 ve Ki-67 immünreaktivite indeksleri: Şekil 5'de bu çalışmada saptanan p53 ve Ki-67 immünreaktiviteleri arasındaki istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmektedir ($r:0.665$, $p<0.0001$).

TARTIŞMA

Mesanenin düşük gradeli papiller ürotelyal tümörlerinin biyolojik potansiyelini belirlemek, patolojik sınıflandırma ve tanımlama konusunda standardizasyon eksikliği nedeniyle oldukça zordur (9,10). Düşük gradeli noninvaziv papiller tümörlerin bir "neoplazi" mi bir "papiller hiperplazi" mi olduğu noktasında, farklı düşünceler 1998 WHO/ISUP konsensusunda dile getirilmiştir. Bu tartışmaya Murphy'nin içinde bulunduğu konsensus katılımcıları şu şekilde katılmıştır (11). "Düşük gradeli noninvaziv papiller tümörleri olan hastalar genellikle progressif olaylara maruz kalmazlar. Neoplazi gerçek bir kansinom olmadığı sürece ürotelyal neoplaziden ölüm ge-



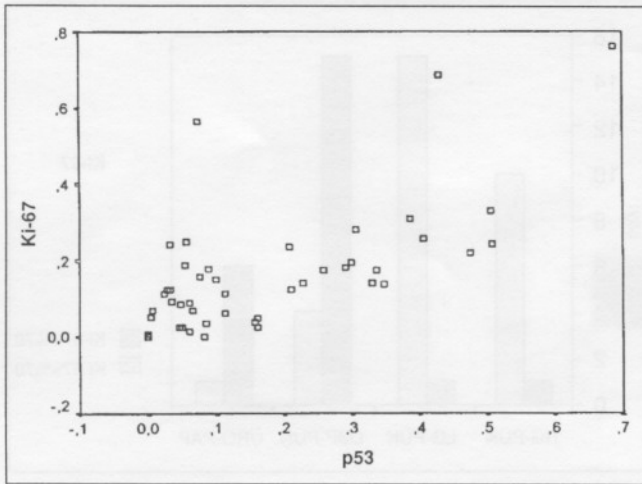
Şekil 3: Ki-67 overekspresyonunun subgruplara göre dağılımı



Şekil 4: Eşik değeri %10 olarak alındığında Ki-67 overekspresyonunun nüks eden ve etmeyen olgulardaki dağılımı

nellikle hiç görülmez ve ölümlerin tümü neredeyse yüksek grade invaziv kansinomların gelişimi ile ilişkilidir. Bir başka şekilde söylersek de, mesane kanserinden ölen hastaların neredeyse tümü başlangıçta tanı konduğunda yüksek grade invaziv kanserlerdir (11,12)." Bu görüşün tanınmasından sonra, 1998 WHO/ISUP sistemi, papiller ürotelyal tümörler ile ilgili olarak patoloğa ve üroloğa tartışma kaynağı olan bir çok konuya açıklık getirmiş ve papiller neoplazilerin morfolojik özellikleri ve tanısal terminolojinin ortak kullanımı adına yararlı bir girişim olmuştur (13).

Biz çalışma grubumuzu belirlerken histolojik grade'lerini göz önüne almadan, ilk tanılarında pTa (AJCC/UICC) evreli olarak sınıflanmış olguları retrospektif olarak tekrar gözden geçirdik. Çalışma kapsamımızdaki 48 olguyu, WHO/ISUP konsensus sınıflamasına göre "noninvaziv papiller ürotelyal neoplazm" başlığı altında toplayarak araştırmamızı başlattık. Mesane ÜHK'larındaki pek çok araştırma, rekürrensteki ve progresyondaki risk faktörlerinin ortaya çıkarılması üzerinedir. Bu güne kadar en önemli faktörler klinik ve histopatolojik parametreler olarak görünmektedir (14). Hastanın veya tümörün, DNA, kan grubu, biyokimyasal ve antijenik özellikleri gibi diğer özellikleri ve son dönemde ekstrasellüler matriks,



Şekil 5: p53 ve Ki-67 immünreaktivite arasındaki istatistiksel ilişki

hücre adhezyon molekülleri, büyüme faktörleri, kromozomal ve genetik bozukluklar, tümör antijenleri ve proliferasyon markerlerinin prognostik özellikleri geniş biçimde incelendi. Ancak bu güne kadar bu markerlardan prognozu göstermek için rutin de kullanılan olmadı. Tümör stage'nin yanında grade en önemli klinik belirleyici olmasına rağmen prognostik bir faktör olarak subjektif histolojik grade'lemenin rolü reproduktibilitesinin az görülmesine bağlı tartışmalı bir durumdur (15).

Morfolojik bulgular, ürotelyal neoplazilerin kategorilerinin belirlenmesinde en iyi yaklaşım mıdır? WHO/ISUP'a göre sınıflandırma, hastalık sonuçlarıyla uyum gösterecek objektif markerları gerektirir mi? Bu sorulara yanıt arayışı içinde çalışmamızda, biyolojik aktivite ve hastalığın aktivitesinin objektif göstergeleri olarak tümör markerları kullanarak morfolojik yaklaşımımızı tamamlamak istedik. Bu amaçla olgularımızda, immünohistokimyasal yöntemle, tümör supresör gen olan p53 değişiminin ve hücre siklusunun aktif fazlarında olan hücrelerin nükleer bir antijenini tanıyan Ki-67 (MIB-1) antikorunun, WHO/ISUP sınıflaması ve nüks ile ilişkisinde prognostik önemini araştırdık. Bu konuda WHO/ISUP yeni sınıflamasının noninvaziv papiller neoplazmları ile ilgili olarak altgruplar ile immünohistokimyasal olarak tümör markerlarının korelasyonunu araştıran yapılmış çalışmaya literatürlerde rastlayamadık.

İmmünohistokimya (İHK) ile p53 birikiminin tanımlanması, genin sadece sınırlı bir kısmının incelenemediği polimerase chain reaction (PCR) analizinden daha doğru bir şekilde p53 mutasyon insidansını gösterebilir. İHK, p53 nükleer ekspresyon gösteren tek bir hücreyi bile ayırd edebilir (16). p53 immünohistokimyası ile ilgili farklı yorumlar vardır. İHK olarak saptanan p53 overekspresyonunun her zaman mutasyon anlamına gelmeyeceği, yanlış (+) ve yanlış (-) sonuçların olabileceği düşünülmektedir (17). Burada, fiksasyon, doku takibi ve İHK tekniklerin yanı sıra mutant p53 proteinin özellikleri de önem taşımaktadır. Çalışmamızda, p53 supresör gen ürünü olan 53 kD ağırlığındaki fosfoproteini hem mutant hem de wild tip p53 proteinini tanıyan Do-7 ve BP53-12 epitoplarına karşı geliştirilen monoklonal antikor kullanılmıştır (18).

Mesane ÜHK'larda her bir histopatolojik evre ve grade'de boyanma yoğunluklarında farklılıklar gösterse de, histolojik evre ve grade ile p53 boyanmış hücrelerin yüzdesi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (16). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mesane ÜHK'larının %50-65'inde saptanan p53 gen değişimi, yüksek histolojik grade, ileri evre, rekürrens, progresyon ve sürvi ile ilişkili bulunmuştur (19,16,20,

21,22). Wright'ın yaptığı çalışmada p53 mutasyonu gösteren tümörlerin daha yüksek grade, evre ve artan rekürrens eğilimine sahip olduğu gösterilmiştir (23). Az sayıda olmakla birlikte p53 overekspresyonu ile histolojik grade ve patolojik evre arasında ilişki olmadığını ortaya koyan çalışmalar da vardır (7,24).

Mesane kanseri tümör progresyonunda, hangi basamakta p53 mutasyonlarının meydana geldiği henüz açık değildir (25). Yüzeyel mesane kanserleri için p53 ekspresyonunun prognostik önemi, ilk olarak Sarkis ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Çalışmalarında p53 nükleer overekspresyonunun mesane kanserinde ilk olaylardan biri olduğunu ve karinoma in situ olgularında %48 oranında bulunduğunu savunmuşlardır (26). Wagner ve arkadaşları karinoma in situ ve pTa vakalarında yüksek oranda p53 overekspresyonu saptamış, p53 mutasyonunun mesane karsinogenezinde erken dönemde oluşan bir genetik değişiklik olabileceğini öne sürmüştür (27).

Esrig'in bir başka çalışmasında da, yüzeyel p53 overekspresyonu gösteren tümörlerde yüksek oranda progresyon görülmüştür. Araştırmacı, bu hastaların erken radikal sistektomiden yarar göreceklere savunmuştur (28). Sidransky ve arkadaşları da buna karşı bir görüş olarak yaptıkları çalışmada 17p kaybının ve p53 gen mutasyonunun genellikle yüksek evre ve grade'e sahip hastalarda daha fazla, yüzeyel tümörlerde ise nadir olduğunu iddia etmişlerdir (29,30). Yine benzer olarak Underwood çalışmasında, "p53 mutasyonu invaziv mesane kanseri ile ilişkilidir ve bu da olayın geç bir olay olduğunu gösterir" yorumunu yapmıştır (25). Uygulanan tekniğin farklılığı ya da seçilen antikorun özellikleri ve kullanılan değişik skorum sistemleri gibi faktörlerin elde edilen çelişkili sonuçları açıklayabileceği düşünülmüştür (31).

Çalışmamızda 48 olguda p53 immünoreaktivite indeksinin %0 ile %68.67 arasında değişkenlik gösterdiğini belirledik. Diğer çalışmalarda benzer İHK değerlendirme ile saptanan p53 overekspresyonu oranı %55-65 arasında değişmektedir (7). p53 immünoreaktivitesi görülmeyen 4 olgunun hepsi benign bir neoplazm olarak değerlendirilen "ürotelyal papillom" sub grubuna aittir. Belirlenen eşik değer diğer çalışmalarda %1-22 arasındadır. Diğerleri ile uyum gösteren mevcut çalışmalar mesane karsinomlu hasta popülasyonunun tamamı için klinik olarak anlamlı eşik değerin %20 civarında olduğunu göstermektedir. Çalışmamız için belirlediğimiz %22 eşik değeri histolojik grade ile ve literatürler ile en uyumlu değerdir. p53 immünoreaktivite indeksleri için %22 eşik değer olarak alındığında, olguların 15 tanesi (%31.25) p53 immünoreaktivitesi için (+), 33 tanesi (%68.75) p53 immünoreaktivitesi için (-)'tir. Altgruplardaki dağılımına baktığımızda ise, ÜP ve LMP-PÜN grubundaki olguların tümünde p53 ekspresyonu eşik değerin altındadır. LG-PÜK alt grubunda olguların %50'sinde p53 ekspresyonu eşik değerin üzerinde ve HG-PÜK alt grubunda olguların yaklaşık %73'ünde p53 ekspresyonu eşik değerin üzerinde olup en yüksek oran bu gruptadır.

Çalışmamızda bu eşik değere göre, WHO/ISUP sınıflamasına göre değerlendirdiğimiz supgruplarda grade ile p53 overekspresyonu arasında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki vardır. ($p < 0.0001$) Gruplarda saptanan p53 immünoreaktivite indeksleri, ürotelyal papillomdan (ÜP) yüksek gradeli papiller ürotelyal karsinoma (HG-PÜK) doğru grade yükselmesine paralel olarak artmaktadır. p53 immünoreaktivitesindeki, istatistiksel olarak saptanan bu ileri derecede anlamlı ilişki sırasıyla en yüksek belirgin fark ürotelyal papillom (ÜP) ile yüksek gradeli papiller ürotelyal karsinom (HG-PÜK) arasında ve anlamlı en düşük fark ÜP ile LMP-PÜN arasında-

dır. Burada özellikle p53 immünreaktivite indekslerinin, ÜP ve LMP-PÜN'lı olguları içeren düşük gradeli neoplazmlar ile LG-PÜK ve HG-PÜK'lu olguları içeren karsinom grupları arasındaki ileri derece anlamlı ($r=0.620$, $p<0.0001$) istatistiki ilişki dikkat çekicidir. Olgularımızın morfolojik olarak WHO/ ISUP sınıflamasını kullanarak özellikle LMP-PÜN ile LG-PÜK subgruplarını belirlemenin öneminin immünohistokimyasal bulgularla da desteklenmiş olduğunu gördük. LMP-PÜN ile LG-PÜK ayrımında morfolojik olarak zorlandığımız olgularda immünohistokimyasal çalışma yapmanın, aynı zamanda morfolojiyi değerlendirme olanağı vermesinin yanı sıra bu iki grubun anlamlı olarak farklı p53 ekspresyonu göstermesinin bize bu ayırımı yardımcı olabileceği sonucuna vardık. Ek olarak bu iki grubun farklı klinik davranış sergileyebileceği ipuçlarını verebileceğini gördük. Bunu görmek için de nüks ve progresyon açısından altgruplardaki p53 korelasyonunun analizini yaptık.

p53 immünreaktivitesi ile nüks ve progresyon arasındaki ilişkiler araştırılırken, sadece nüks eden olguların p53 ile korelasyonunun istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır. Çalışmamızda İHK olarak belirlenen %22 eşik değere göre p53 overekspresyonu nüks eden olgularda nüks etmeyen olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır ($p=0.004$). p53 immünreaktivitesi ile nüks eden olguların altgruplardaki dağılımının korelasyonuna bakıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($r=0.676$, $p<0.0001$). ÜP ve LMP-PÜN gruplarındaki nüks eden ve LG-PÜK ve HG-PÜK gruplarındaki nüks eden olgular ile p53 immün reaktivitesinin korelasyonuna bakıldığında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki bulunmuştur ($r=0.620$, $p<0.0001$). Bu bulgular benzer şekilde kliniğe tümörün agresiv davranışı şeklinde yansıdığını düşündürmektedir. Vollmer ve arkadaşlarının çalışmasında p53 mutasyonunun agresiv klinik davranışla ilişkili olduğunu belirlemeleri bulgumuzu desteklemektedir (31). Esrig yine bir başka çalışmasında nükleer p53 birikiminin, stage veya grade'den çok tümör rekürrensi ve azalmış sağ yaşam süresi ile yakından ilişkili olduğunu savunmuş (32). Karşı olarak Gardiner, p53 durumunun hastalık gidişi ile ilgili olmadığını göstermiştir (33).

İnsan tümör hücrelerinin proliferasyonunu ölçmek oldukça zordur, fakat bunun klinik açıdan önemi büyüktür. Tümör dokularında proliferasyon hızı nüks, metastaz potansiyeli ve mortaliteyi yansıtmaktadır. Proliferasyon hızını belirlemek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunların arasında Ki-67 immünreaktivitesi indeksi en popüler olan yöntemdir. İHK olarak uygulanan Ki-67 antikoruna hücre siklusunun G0 (dinlenme) fazı dışında proliferasyon yapan tüm hücreler belirlenebilmektedir. İmmünojen olarak Ki-67 antijeninin 'MIB-1' olarak isimlendirilen rekombinan kısımları, mesane karsinomu olgularında Ki-67 eşdeğeri olarak, monoklonal antikor oluşumu için kullanılmıştır (16).

Çalışmamızda Ki-67 immünreaktivite indeksinin %0 ile %68.7 arasında değişkenlik gösterdiğini belirledik. Subgruplarda saptanan Ki-67 immünreaktivite indeksleri, ürotelyal papillomdan (ÜP) yüksek grade papiller ürotelyal karsinoma (HG-PÜK) doğru grade yükselmesine paralel olarak artmaktadır. Ki-67 immünreaktivitesindeki istatistiksel olarak saptanan bu ileri derecede anlamlı ilişki sırasıyla en yüksek belirgin fark ürotelyal papillom (ÜP) ile yüksek gradeli papiller ürotelyal karsinom (HG-PÜK) arasında ve anlamlı en düşük fark ÜP ile LMP-PÜN arasındadır. Burada özellikle Ki-67 immünreaktivite indekslerinin, ÜP ve LMP-PÜN'lı olgular ile LG-PÜK ve HG-PÜK'lu olgular arasındaki ileri derece anlamlı ($r=0.546$, $p<0.0001$) istatistiki ilişkisi dikkat çekicidir.

Ki-67 immünreaktivite indeksleri için %10 eşik değer olarak alındığında, olguların 28 tanesi (%58.33) Ki-67 immünre-

aktivitesi için (+), 20 tanesi (%41.66) Ki-67 immünreaktivitesi için (-)'tir. Gruplardaki dağılımına baktığımızda ise göre ÜP sub grubunda olguların %14'ünde, LMP-PÜN grubunda %12'sinde, LG-PÜK sub grubunda olguların %92'sinde ve HG-PÜK sub grubunda olguların yaklaşık %91'ünde Ki-67 ekspresyonu eşik değerin üzerindedir. Eşik değere göre de Ki-67 overekspresyonu gösteren olgu sayılarının düşük gradeli neoplazm (ÜP ve LMP-PÜN) gruplarına göre karsinom gruplarında (LG-PÜK ve HG-PÜK) belirgin olarak yüksek olduğu görülmüştür. Eşik değere göre, altgruplar ile Ki-67 overekspresyonu arasında istatistiksel olarak ileri derece anlamlı ilişki vardır ($p<0.0001$). Eşik değerin belirlenmesi literatürde değişik şekillerde yer almaktadır. Esrig ve Spruck'un çalışmalarında seçtikleri eşik değeri, biz de gen mutasyonu ile ilişkili immünboyanma seviyesini en iyi belirleyen değer olarak düşündüğümüz için olgularımızda %10 olarak belirledik. Daha önce yapılan çok sayıda araştırma, Ki-67 'nin daha önce kullanılan histolojik grade'leme sistemleri ile olan korelasyonuna dair çalışmalardır (7,16,32,34,35,36). Ki-67 immünreaktivite indeksinin grade ve evre ile ileri derecede anlamlı ve histolojik grade'e göre daha anlamlı objektif bir kriter olduğunu, klinik davranışı belirleyebilecek bir prognostik faktör olarak kabul edilebileceğini belirtmektedir (35). Cohen ve arkadaşları, Ki-67' yi de içeren 5 ayrı proliferasyon markeri ile yaptıkları çalışmada, mesane ÜHK'larında histolojik grade ile proliferasyon indeksi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (36). Bush ve arkadaşları, Ki-67 immünreaktivite indeksini histolojik grade ve evre ile ilişkili, nüks ile ilişkiz olarak saptamışlardır (37). Çalışmamızda nüks eden olgularda Ki-67 immünreaktivite indeksi, nüks göstermeyenlere göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ki-67 immünreaktivitesi ile nüks ve progresyon arasındaki ilişkiler araştırılırken sadece nüks eden olguların Ki-67 ile korelasyonunun istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır. Progrese eden olguların sayısı çok az olduğundan istatistiksel çalışmaların kapsamı dışında bırakılmıştır. %10 eşik değere göre Ki-67 overekspresyonunu ve Ki-67 immünreaktivitesinin nüks eden olgular ile arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardır. ($p=0.001$, $p=0.007$). Ki-67 immünreaktivitesi ile nüks eden olguların subgruplardaki dağılımının korelasyonuna bakıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ($r=0.381$, $p<0.007$). Vorreuther ve arkadaşlarının da Ki-67 immünreaktivite indeksini nüks ile ileri derecede anlamlı düzeyde ilişkili saptamaları, bu bulgumuzu desteklemektedir (38). Çalışmamızda İHK olarak değerlendirilen p53 ve Ki-67 immünreaktivite indeksleri ile istatistiksel olarak anlamlı derecede uyumludur ($r=0.665$, $p<0.0001$). Bu bulgu, İHK olarak izlenen p53 overekspresyonunun p53 mutasyonunu doğru bir şekilde yansıttığını düşündürmektedir. Mutant p53 gen ürününün nonfonksiyone olması ya da dominant olduğu için var olsa bile normal-wild tip p53 proteininin fonksiyonunu yapamamasına bağlı olarak, hücre siklusunun kontrolsüz bir şekilde sürdüğünü desteklemektedir. Başka çalışmalarda da Ki-67 indeksi ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmış ve bu durum benzer şekilde açıklanmıştır (7,16,20,37). Popov ve arkadaşları p53 overekspresyonu ve Ki-67 pozitivitesinin klinikopatolojik parametrelerden bağımsız prognostik belirleyici olduğunu öne sürmüşlerdir (16). Bu görüşü destekleyen başka çalışmalar da vardır (39).

Çalışmamızın sonucunda, İHK olarak belirlenen p53 ve Ki-67 immünreaktivitesinin, WHO/ISUP sınıflamasına göre yeniden sınıfladığımız noninvaзив papiller ürotelyal tümörlü olgularımızın morfolojik subgrupları ile istatistiksel olarak ileri derece anlamlı düzeyde ilişkili olduğu saptanmıştır.

p53 ve Ki-67 immünreaktivitesinin nüks eden olguların altgruplardaki dağılımının korelasyonuna bakıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür. p53: ($r=0.676$, $p<0.0001$), Ki-67: ($r=0.381$, $p<0.007$).

p53 immünreaktivite değerleri eşik değerin (%22) altındaki olgularımızın çoğunda nüks görülmedi. p53 immünreaktivitesi eşik değerin üzerinde olan olgularımızın klinik davranışı hakkında kesin bir yargıya varılamadı. Bunun nedeni olarak da olguların ortalama takip sürelerinin düşük olması ve klinik kontrollerinin düzenli olmaması gösterilebilir.

Ki-67 immünreaktivite değerleri eşik değerin (%10)'un altında olan olgularımızda nüks belirgin olarak azdır.

Bizim çalışmamızda nüksü belirlemede Ki-67, p53'e göre daha değerli gibi görünmektedir. Mesanenin noninvaziv papiller ürotelyal hücreli tümörlerin biyolojik davranışı yansıtmada Ki-67'yi daha başarılı bulmakla beraber, p53 ve Ki-67'nin birbirlerine üstünlüğü çarpıcı değildir. Ki-67 ve p53 immünreaktivitesinin, histopatolojik prognostik faktörlere eklenmesinin, nüks riskini belirlemeye yardımcı olarak, hastalarda uygun ve etkili tedavi seçimi ile izlem sürecinde sıklığın belirlenmesinde klinik yarar sağlayacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM, Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading. *Cancer* 1987; 60: 2766-2774.
- Leblanc B, Duclos AJ, Bernard F, Cote J, Valiquette, Paquin JM. Long-term Follow up of initial pta grade I transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 1999; 162: 1946-50.
- Cheng L, Neumann RM, Bostwick DG, Papillary urothelial neoplasms of low malignant potential: Clinical and biologic implications. *Cancer* 1999; 86: 2102-08.
- Harnden P, Southgate J. Revised classification of urothelial neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 160-162.
- Carbin Bengt E, Ekman P, Gustafson H, Christensen NJ. Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency: histological description. *J Urol*. 1991; 145: 968-971.
- Amin Mahul B, Mostofi Fathollah K. The WHO/ISUP C.C. of urothelial neoplasm continued discussion. *Hum Pathol* 1999;30(7):879-880.
- Tsuji M, Kojima K., Murakami, Y, Kanayama H, Kagawa S. Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein urinary bladder cancer: Immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* 1997 79:367-72.
- Ebstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of urothelial (transitional cell) neoplasm of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 1998;22: 1435-48.
- Bostwick DG. Natural history of early bladder cancer. *J Cell Biochem* 1992;161:31-38.
- Hankey BF, Edwards BK, Ries LA. Problem in cancer surveillance: Delineating in situ and invasive bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83: 384-385
- Holmang S, Hedelin S, Anderström C, Holmberg E. Recurrence and progression in low grade papillary urothelial tumors. *J Urol*. 1999; 162:702-07.
- Murphy WM. Bladder Cancer Redefined. *Cancer* 1999;86:1890-92.
- Amin Mahul B, Mostofi Fathollah K. The WHO/ISUP C.C. of Urothelial Neoplasm Continued Discussion. *Hum Pathol* 1999;30(7):879-880.
- Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Hafermann D, Hawkins IR. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083-1086.
- Kern WH. The grade and pathologic stage of bladder cancer. *Cancer* 1984;53:1185-1189.
- Popov Z, Hoznek A, Colombel M. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 1997; 80: 1472-1480.
- Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: Can we trust immunohistochemistry? Revisited (editorial). *J Pathol*. 1994; 172: 1-4.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
- Cordon-Cardo C, Reuter VE. Alterations of tumor suppressor genes in bladder cancer. *Semin Diagn Pathol*. 1997; 2: 123-32.
- Kusser WC, Miao X, Glickman BW, Friedland JM, Rothman N, Hermstret GP, Mellot J, Swan DC, Schulte PA, Hayes RB. p53 mutations in human bladder cancer. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24: 156-160.
- Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. Prognostic markers in bladder cancer: A contemporary review of the literature. *J Urol*. 1998; 160: 645-59
- Krüger S, Müller H. Correlation of morphometry, nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *British J of Urol*. 1995; 75: 480-484.
- Wright C, Mellon K, Johnston P, Lane DP, et al. Expression of mutant p53, c-erbB-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer*. 63: 967-970, 1991.
- Vatne V, Maartmann-Moe H, Hoestmark J. Flow cytometric DNA and p53 analysis in superficially infiltrating bladder carcinoma. *Anticancer Res*. 1994; 14: 2735-8.
- Underwood MA, Smith RG, Gardiner DS, Scott R, Bartlett J, Cooke TG. Overexpression of p53 protein and significans for recurrent progressive bladder tumours. *Br J Urol*. 1996; 77: 659-66.
- Sarkis AS, Bajorin, DF, Reuter, VE, Herr HW, et al.: Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *Journal of Clinical Oncology*. 1995; 13: 1384-1390.
- Wagner U, Sauter G, Moch H, Novotna H, Epper R, Mihatsch MJ, Waldman FM.: Patterns of p53, erb-2 and EGF-r expression in premalignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1995; 26: 970-78.
- Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groschen S, Chen SC, Skinner DG, Jones PA, Cote RJ.: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*. 1993; 143: 1389-1397.
- Sidransky D, Messing E. Molecular genetics and biochemical mechanisms in bladder cancer. *Oncogenes, tumor suppressor genes and growth factors. Urologic Clinics of North America*, 1992; 19: 629-639.
- Schalcken JA, Debruyne FMJ: Prognostic indicators of bladder cancer. *Current Opinion in Urology*. 1995; 5: 272-274.
- Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, Wick MR, Hudson MA. Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma. Its relation to histologic grade and expression of p53, MIB-1, c-erb-2, epidermal growth factor receptor and bcl-2. *Cancer* 1998; 82: 715-723.
- Esrig D, Elmajian D, Groschen S, Freeman JA, Stein JP.: Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *The New Eng J Med*. 1994; 10:1259-63.
- Gardiner RA, Wals, MD, Allen, V, Rahman, S, et al. Immunohistological expression of p53 in primary pT1 transitional cell bladder cancer in relation to tumour progression. *B J Urol* 1994; 73: 526-532.
- Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakipoulou H, Dimopoulos MA. The prevalence of bcl-2l p53 and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998;29:146-54.
- Wright C, Mellon K, Thomas D. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: Correlation with Ki-67 index. *Br J Urol* 1995;75:173-179.
- Cohen MB, Waldman FM, Carol PR, Kerschmann R, Chew K, Mayall B.H. Comparison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* 1993;24:772-78.
- Bush C, Price P, Norton J, Parkins CS, Bailey MJ, Boyd J. Proliferation in human bladder carcinoma measured by Ki-67 antibody labelling: Its potential clinical importance. *Br J Cancer* 1991;64:357-60.
- Vorreuther R, Hake R, Borchmann P, Lukowski S, Thile J, Engelmann U. Expression of immunohistochemical markers (PCNA, Ki-67, 486p ve p53) on paraffin sections and their relation to the recurrence rate of superficial bladders tumors. *Urol Int*. 1997; 59: 88-94.
- Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H, Vejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by Brd Urd and Ki-67 immunostaining. *J Urol* 1991; 145: 846-49.