

Renal Cell Karsinoma'larda P-Glikoprotein Salınımı ve Ki-67 Proliferatif Aktivitesinin Multipl Prognostik Faktörlerle İlişkisi *

Dr. Ömer Yerci **, Dr. Gülaydan Filiz **, Dr. Sema Özuysal **, Dr. İsmet Yavaşcaoglu ***, Dr. Billur Şamlı **, Dr. Şaduman Balaban Adım **

ÖZET

Çalışmamızda 1980-1995 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında renal cell karsinoma tanısı alan 77 olgunun histolojik kesitleri grade, stage, hücre tipi, dizilim patterni ve diğer prognostik parametreler ışığında yeniden değerlendirildi. Olguların 41'i erkek, 36'sı kadın idi. En küçük yaş 40 iken en büyük yaş 72 (ortalama yaş 60) olarak bulundu. 58 adet stage I, 14 adet stage II, dört adet stage III, bir adet stage IV tümör mevcuttu. Stage ve grade'in Fisher's exact testi ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi.

29 olgu fakültemiz üroloji kliniği tarafından iki yıl takip edilmişlerdi. Prognozu bilinen bu olgularda immunohistokimyasal boyama yöntemi ile P-glikoprotein salınımı ve Ki-67 proliferatif aktivitesinin multipl prognostik faktörlerle ilişkisi araştırıldı.

Rutin olarak fikse edilmiş parafin bloklardan elde edilen kesitler immunohistokimyasal olarak DAKO nun (3522) nolu ürünü P-glikoprotein ve (N1574) nolu ürünü Ki-67 ile boyandı.

P-glikoprotein boyanması hücrelerde sitoplazmik, luminal yada paranükleer, Ki-67 ise nükleer olarak gözlemlendi.

P-glikoprotein salınımı grade I olan iki olguda negatif olarak bulunurken, diğer olgularda çeşitli derecelerde pozitiflik saptandı.

İstatistiksel olarak iki yıllık takibi olan olgularda multipl prognostik faktörler ile P-glikoprotein salınımı ve Ki-67 proliferatif aktivitesi arasında ilişki saptanmadı. P-glikoprotein salınımının ilaç direnci ile ilişkili olmasına rağmen prognozla ilişkisi olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Renal cell karsinoma, P-glikoprotein, Ki-67

GİRİŞ

Renal cell karsinomalar tüm malignansilerin yaklaşık % 3 ünü oluştururlar. İnsidansları 4/100,000 dir. 1826 da tanımlanmalarına rağmen halen davranışları anlaşılmamıştır. 1983 yılında Grawitz tümörü görünüşü şaşırtıcı şeklide adrenal kortekse benzeyen sarı renkli renal tümör olarak tarif etmiştir. Daha sonraları ışık ve elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde renal tubulus epitelinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (1). Hastalık hakkında elde ettiğimiz bilgiler prognoz ve yaşam süreleri arasında doğru ilişki kurmamızı sağlayacak ve tedaviye

SUMMARY

The correlation of P-glycoprotein secretion and Ki-67 proliferative activity with multiple prognostic factors in renal cell carcinoma

In our study the histological sections of 77 cases with a diagnosis of renal cell carcinoma were reviewed according to tumor grade, stage, cell type, microscopic pattern and other prognostic factors in the Pathology Department of Uludağ University School of Medicine.

41 Patients were male and 36 were female. The youngest patient was 40 years old and the oldest patient was 70 (mean age 60) 58 cases were stage I, 14 stage II, four stage III and one stage IV.

A positive correlation between the tumor stage and grade was found with Fisher's exact test, 29 of the patient's were followed-up by the Urology Clinic of our University Hospital.

The correlation of P-glycoprotein secretion and Ki-67 proliferative activity with multipl prognostic factors were evaluated by immunohistochemical staining method in 29 cases with known prognosis.

Sections obtained from routinely fixed and paraffin embedded material were stained immunohistochemically for P-glycoprotein (DAKO's product no: 3522) and Ki-67 (DAKO's product no: N1574).

P-glycoprotein staining was observed in the cells as cytoplasmic, luminal or paranuclear and Ki-67 staining was nuclear.

Two cases with grade I tumors were negative for P-glycoprotein secretion whereas the other cases exhibited variabl positivity.

No statiistical correlation was found between P-glycoprotein, Ki-67 proliferative activity and multiple prognostic factors in the cases with a 2-year follow-up. It was concluded thet although P-glycoprotein secretion was associated with drug resistance, it was not related to prognosis.

Key Words: Renal cell carcinoma, P-glycoprotein, Ki-67

* XIII. Ulusal Patoloji Kongresinde tebliğ edilmiştir.

** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Bursa

*** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji AD, Bursa

yardımcı olacaktır. Sistemik tedaviden elde edilen sonuçlar hayal kırıklığı yaratmışsa da, yakında yeni denemeler sonucunda efektif adjuvan tedavi şemasının bulunacağı umulmaktadır.

Tümörlerde kemoterapi uygulanmasında en büyük engel ilaç rezistansıdır. İlaça dirençli hücre dizilerinde P-glikoprotein olarak adlandırılan membran glikoproteininin fazla salındığı tespit edilmiştir. P-glikoprotein 170-kilodaltonluk plazma membran glikoproteinidir. (2). Fonksiyonunun molekülü pompalayarak almak ve hidrofobik antikanser ilaçların hücre dışına geçişini sağlamak olduğu varsayılmaktadır. İnsan P-glikoproteinini kodlayan gen *mdr1* olarak adlandırılmaktadır (3).

Birçok tümör hücre dizilerinde invitro olarak vinblastin, doxorubicincolchicine ve diğer antikanser ilaçların konsantrasyonunun artması ile birlikte P-glikoproteininin fazla salındığı gösterilmiştir. Çalışmalarda insan tümörlerinde P-glikoprotein salınımı saptanmış, bazı lösemi tiplerinde ilaç direnci ile ilişkisi gösterilmiştir. Çoğu tümörde P-glikoprotein salındığı saptanmıştır. P-glikoprotein bu tümörlerde intrinsik ilaç direncinden sorumlu olabilir.

Renal cell karsinomalar antikanser ilaçlara oldukça dirençlidir. Renal cell karsinomalarda *mdr1* messenger RNA'nın arttığını gösteren birçok çalışma yapılmıştır.

Ki-67 çeşitli kanser tiplerinde proliferatif aktivitenin tespiti için kullanılan bir metoddur. Ki-67, Hodgkin hastalığı hücre dizilerinin nükleer fraksiyonlarından elde edilmiştir. Hücre siklusunda G 0 dışındaki tüm devrelerde salınarak nükleer antijenlere bağlanır. Farklı tümör tiplerinde çeşitli sonuçlar alınmıştır. Renal cell karsinomalarda birçok yayında Ki-67 proliferatif aktivitesinin stage, grade ve prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (4,5).

Çalışmamızda renal cell karsinoma olgularının parafin bloklarından elde ettiğimiz kesitlerde immunohistokimyasal olarak P-glikoprotein varlığının ve Ki-67 proliferatif aktivitesinin multipl prognostik parametrelerle ilişkisini göstermeye çalıştık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 1990-1996 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda renal cell karsinoma tanısı almış 77 olgunun rutin olarak fikse edilmiş parafin bloklarından elde edilen kesitleri, yaş, cins, tümör çapı, histolojik grade, stage hücre tipi, dizilim patterni, lenfositik infiltrasyon, nekroz, böbrek kapsülü infiltrasyonu, pelvis renalis invazyonu, üreter tutulumu, renal ven invazyonu gibi çeşitli prognostik parametreler ışığında yeniden incelendi. Tümör dokularında grade Fuhrman kriterlerine, stage TNM klasifikasyonuna göre değerlendirildi.

İki yıllık klinik takibi bulunan 29 olguya ait tümör dokularından seçilen örnekler immunohistokimyasal olarak streptavidin-biotin-peroxidase tekniği ile Ki-67 ve P-glikoprotein boyaması yapıldı.

Ki-67 için normal tonsil dokusu, P-glikoprotein için endometrium adenokarsinomu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Ki-67 boyamasının değerlendirilmesinde her olguda rastgele seçilmiş alanlardan oküler mikrometre ile 400x büyütmede 500 hücre sayıldı. Boyanma gösteren hücrelerin tüm hücrelere

oranı % olarak hesaplanarak tümör proliferasyon indeksi belirlendi.

P-glikoprotein boyamasının değerlendirilmesinde ise boyanma olmamış ise (-), zayıf boyanma (+), orta derecede boyanma (++) , kuvvetli boyanma (+++) olarak belirlendi. Klinik prognozu bilinen 29 olgunun iki yıllık takip sonuçlarının yukarıdaki prognostik parametrelerle ilişkisi araştırıldı. İstatistiksel değerlendirilmelerde Fisher's exact testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmadaki 77 olgunun 41'i (% 53,2) erkek , 36'sı (% 46,8) kadın olup belirgin bir cinsiyet farkı görülmedi. En küçük yaş 40 en büyük yaş 72, ortalama yaş 60 idi. En küçük tümör çapı 2,5 cm, en büyük tümör çapı 15 cm iken, ortalama tümör çapı 7 cm idi. Tümör olgularının çapları ile grade ve stage arasında korelasyon bulunmadı.

Olguların 14 tanesi grade I, 33 tanesi grade II, 15 tanesi grade III, 15 tanesi grade IV olarak değerlendirildi. Tümör dokuları oluşturan hücre tipleri 19 olguda berrak, 37 olguda granüler, dört olguda fuziform şekilli idi ve 17 si mikst hücrelerden oluşmuştu. Grade ve hücre tipi arasındaki ilişki tablo I de gösterildi.

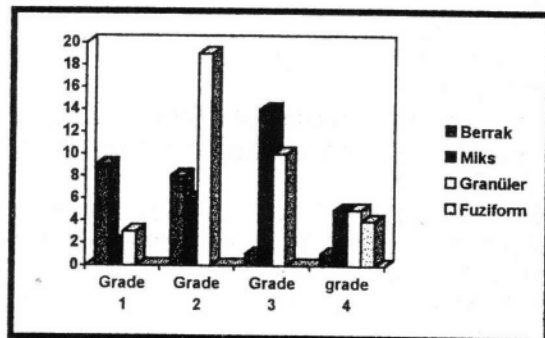
Hücre tipi ile grade karşılaştırıldığında düşük ve yüksek grade'li renal cell karsinomlarında berrak ve granüler hücre tipi olmalarına göre Fisher's exact testi ile ($p < 0,001$) anlamlı ilişki saptandı. Ancak prognozu bilinen 29 olgunun incelenmesinde hücre tipi ile prognoz arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmadı. Tümör dokudaki hücrelerin dizilim paternleri 27 olguda alveoler, dokuz olguda papiller, 10 olguda solid, sekiz olguda trabeküler, beş olguda sarkomatoid, sekiz olguda glandüler ve 10 olguda mikst olarak saptandı. Dizilim paternleri ile gradenin karşılaştırılması tablo 2'de gösterildi.

Dizilim patterni ile grade karşılaştırıldığında prognozu bilinen 20 olguda Fisher's exact testi ile alveoler ve sarkomatoid dağılım paterni ve papiller ve sarkomatoid dizilim paterni arasında ($p < 0,01$) farklılık bulundu.

Olgulardaki lenfositik infiltrasyon, nekroz, böbrek kapsülü infiltrasyonu, pelvis renalis invazyonu ve üreter invazyonunun grade ve stage ile ilişkisi tablo 3'de gösterildi.

Yukarıdaki prognostik parametrelerle grade ve stage arasında istatistiksel ilişki saptanmadı.

Tablo 1: Grade ve hücre tipi arasındaki ilişki



Tablo 2: Dizilim patterni ve grade'nin karşılaştırılması

	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Alveoler	5	15	3	4
Glanduler	2	3	2	1
Solit	5	2	2	-
Trabeküler	2	4	2	-
Papiller	-	6	2	1
Sarkomatid	-	-	-	5
Miks	-	3	4	4

Tablo 3: Grade, stage ve multipl prognostik parametreler arasındaki ilişki

		Olgu sayısı	lenfositik infiltrat(+)	Pelvis renalis tutulumu	Renal ven invazyonu	Üreter invazyonu (+)	Nekroz (+)	Kapsül invazyonu (+)	LN (+)
Gr I	Stg I	12	3	-	-	-	3	2	-
	Stg II	2	-	1	-	-	-	-	-
	Stg III	-	-	-	-	-	-	-	-
	Stg IV	-	-	-	-	-	-	-	-
Gr II	Stg II	23	10	5	-	-	13	-	-
	Stg II	7	5	3	-	-	3	6	-
	Stg III	2	1	-	2	1	1	1	-
	Stg IV	1	-	-	-	-	1	1	1
Gr III	Stg II	11	8	3	1	-	9	-	-
	Stg II	3	-	2	-	-	3	2	1
	Stg III	1	-	-	-	-	1	1	1
	Stg IV	-	-	-	-	-	-	-	-
Gr IV	Stg II	12	-	4	-	-	10	-	-
	Stg II	2	1	1	-	-	2	1	-
	Stg III	1	-	-	-	-	-	-	1

Tablo 4 : Grade, stage ve multipl prognostik parametreler arasındaki ilişki

	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Grade I	12	2	-	-
Grade II	23	7	2	1
Grade III	11	3	1	-
Grade IV	12	2	1	-

Olguların 58'i stage I, 14'ü stage II, dördü stage III, biri stage IV idi. Olgulardaki grade ve stage ilişkisi tablo 4'de gösterildi.

Grade ve stage arasında özellikle stage III ve stage IV gruplarına düşen hasta sayısı çok az olduğundan istatistiksel anlam bulunamadı.

Çalışmamızdaki 77 hastanın 29'u Üroloji kliniğince iki yıl takip edilmişlerdi. Bunlardan üç olgu iki yıl içinde eks olmuş iken 26 olgu hayatta idi.

Bu olgulara yapılan Ki-67 ve P-glikoprotein boyamalarında; Ki-67 pozitifliği nükleer, P-glikoprotein pozitifliği luminal, sitoplazmik yada paranükleer olarak gözlendi.

Ki-67 boyaması ile saptanan tümör proliferasyon indeks

ortalamlarının grade ve stage ile ilişkisi tablo 5'de gösterildi.

Boyamada olası hataları en aza indirmek için tüm preparatlar aynı kişi tarafından boyandı. P-glikoprotein varlığı hücrelerde sitoplazmik, luminal yada paranükleer olarak, Ki-67 pozitifliği ise nükleer olarak gözlendi. P-glikoprotein uygulamasında boyanma olmamışsa -, zayıf boyanma varsa +, orta derecede boyanma varsa ++, kuvvetli boyanma varsa +++ olarak değerlendirildi. P-glikoprotein pozitifliğinin grade, stage, hücre tipi, dağılım patterni ve diğer prognostik faktörlerle ilişkisi saptanmadı.

Ki-67 boyanmasının değerlendirilmesinde rastgele seçilmiş alanlardan oküler mikrometre ile 400x büyütmede 500 hücre sayıldı. Nükleer pozitiflik saptanan hücre sayısı saptandı. Bu oran tümör proliferasyon indeksi olarak tanımlandı.

29 olguda ve P-glikoprotein pozitifliğinin grade, stage, hücre tipi, dağılım patterni ve diğer prognostik faktörlerle ilişkisi saptanmadı.

TARTIŞMA

Renal cell karsinoma yetişkinde renal parankimin en malign tümörü olması sebebiyle önemlidir (6).

İnsidansı yaklaşık 4/100.000 olup tüm malignansilerin % 3'ünü teşkil eder. Genellikle soliter kitle halinde gözlenir. Yuvarlak şekilli, iyi sınırlı ekspansif olarak büyüyen tümörlerdir. Büyüklüğüne bağlı olarak böbrekte sınırlı kalabildiği gibi kapsül dışına, çevre yağ dokusuna ya da Gerota fasyasına ulaşabilir.

Predominant olan hücre tipine göre çok çeşitli renklere olabilir. En karakteristik görünüşü yumuşak kıvamlı kısmen nekrotik yada hemorajik alanlar içeren gri yada sarı parlak kitle halindedir.

Renal cell karsinomalar berrak, granüler, mikst yada fuziform hücreli olabilir. Berrak hücre tipi en yaygın görülenidir. Tümör hücreleri çeşitli miktarlarda glikojen yada lipid içerirler.

Multisentrik tümör görülme olasılığı fazladır. Özellikle von Hippel Lindau hastalarında multisentrik tümör daha sık rastlanır. Tüm yaşlarda görülebilir de en çok 6. Dekatta sıklığı artar. Erkek/kadın oranı 2/1 dir. Sağ ve sol böbrek tutulumu arasında fark yoktur.

1982 yılında Fuhrman ve arkadaşları nükleer grade, hücre tipi ve tümör paternine dayanan kriterler tanımlamışlardır. Bir çok çalışmada granüler hücreli renal cell karsinomaların daha kötü prognoza sahip olduğunu, metastaz yapabilmelerinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (10). Sene ve arkadaşları ise mikst hücre kömpönentine sahip renal cell karsinomaların daha kötü prognoza sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Birçok çalışmada fuziform şekilli hücrelerden oluşanların kötü prognozlu oldukları belirtilmiştir. Papiller tümörlerin prognozları hakkında ise değişik görüşler bildirilmiştir. Araştırmacılar nükleer grade'nin tüm çeşitliliklerden bağımsız olduğunu, ancak yaşam süresi ile ilişkili olmadığını, kesinlikle cerrahi stage ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (1).

İmunohistokimyasal çalışmalar bir çok teknikte uygulanabilir. Bu tekniğin en önemli yararı doku bütünlüğünün bozul-

Tablo 5: Ki-67 boyaması ile saptanan tümör proliferasyon indeks ortalamalarının grade ve stage ile ilişkisi

		Olgu Sayısı	Ortalama tümör Proliferatif indeksi
Gr I	Stg I	12	5,5
	Stg II	2	5,7
	Stg III	-	6,2
	Stg IV	-	7,1
Gr II	Stg I	23	5,8
	Stg II	7	6,4
	Stg III	2	6,3
	Stg IV	1	7
Gr III	Stg I	11	6,7
	Stg II	3	5,2
	Stg III	1	4,1
	Stg IV	-	6,6
Gr IV	Stg I	12	7,2
	Stg II	2	6,7
	Stg III	1	5,6
	Stg IV	-	5,1

Tablo 6: Ki-67 boyaması ile saptanan tümör proliferasyon indeks ortalamalarının grade ve stage ile ilişkisi

		Olgu Sayısı	P-glikoprotein pozitifliği		
			(-)	(+)	(++)
(+++)					
Gr I	Stg I	12	2	4	3
	Stg II	2	-	1	1
	Stg III	-	-	-	-
	Stg IV	-	-	-	-
Gr I	Stg I	23	-	9	10
	Stg II	7	-	1	4
	Stg III	2	-	-	1
	Stg IV	1	-	-	1
Gr I	Stg I	11	-	4	4
	Stg II	3	-	1	1
	Stg III	1	-	-	1
	Stg IV	-	-	-	-
Gr I	Stg I	12	-	2	5
	Stg II	2	-	1	1
	Stg III	1	-	1	-
	Stg IV	-	-	-	-

mamasıdır. Gerekli donanım ucuzdur. Herhangi bir patoloji laboratuvarında uygulanabilir. Gözlemciler arasındaki olası çeşitlilikler genel standartların tanımlanması ile azalacaktır (9).

Ki-67 çeşitli kanser tiplerinde proliferatif aktivitenin tespiti için kullanılan bir metottur. Ki-67 Hodgkin hastalığı hücre dizilerinin nükleer fraksiyonlarından elde edilmiştir. Hücre siklusunda G 0 dışındaki tüm devrelerde salınarak nükleer antijenlere bağlanır. Farklı tümör tiplerinde çeşitli sonuçlar alınmıştır. Lenfomalar, malign melanoma, akciğer ve meme tümörleri bunlar arasındadır. Ki-67 immün boyanması ile triated thymidine ve bromodeoxyuridine uptake arasında kuvvetli ilişki saptanmıştır (14-16).

Renal cell karsinomalarında bir çok yayında Ki-67 proliferatif aktivitesinin stage, grade ve prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (4,5).

Mdr gen varlığı tümörlerde ve normal dokularda saptanmıştır (7,8). P-glikoprotein mdr gen ürünüdür. Sitostatik ilaçların hücreden atılmasında ve pompalanmasına etkili olduğu lösemi vakalarında prognostik önemi olduğu bilinmektedir (9).

P-glikoprotein ekspresyonu kolorektal, mide, akciğer tümör preparatlarının çoğunda tespit edilmiştir (11-13). P-glikoprotein varlığı aynı zamanda RNA üzerinde yerleşmiş olduğu immunohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir.

P-glikoprotein salınımı proksimal tubuluslerin fırçası kenarlarında, epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde yüksektir (3).

Hastaların çoğu iki yıl takip edilebilmişlerdi. Bu süre bir çok tümör gibi renal cell karsinomalar için de prognostik anlam taşıyabilmesi için kısa idi. Hastaların ikisinde von Hippel Lindau sendromu bulunmaktaydı. Ancak bu hastaların incelenmesinden anlamlı sonuç elde edilmedi.

Çalışmamızda olgu sayımız az olduğu için dizilim patterni ve grade karşılaştırdığında Fisher's exact testi ile alveoler ve sarkomatoid dizilim patterni ve grade karşılaştırdığında arasında $p < 0.01$ farklılık bulundu. Aynı zamanda berrak yada granüler hücre tipindeki olguların grade'leri arasında anlamlı ilişki bulundu. Ancak prognozu bilinen hasta sayısının az olması P-glikoprotein varlığı ve Ki-67 proliferatif aktivitesinin prognoz ile ilişkisinin saptanmasına, ileri stage'lerdeki hasta sayısının çok az olması ise stage ve grade arasında korelasyon kurulmasına engel oldu. Çalışma grubu genişletildikçe renal cell karsinomalarında P-glikoprotein ve Ki-67 proliferatif aktivitesinin prognoz ve multipl faktörlerle ilişkisi daha iyi anlaşılacaktır.

P-glikoprotein ile negatif sonuç elde edilen iki hastada kemoterapi uygulanmasında iyi sonuç elde edileceği kanısındayız. Hasta grubunun genişletilip çalışmanın tekrarlanmasıyla daha çok proliferatif aktivitesi tespit edilen ve p-glikoprotein varlığı saptanan olgularda daha etkin tedavinin uygulanması ve prognozun saptanmasında oldukça yararlı ipuçları elde edileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Sene AP, Hunt L, Mc Mahon RFT, Carroll RNP. Renal carcinoma in patients undergoing nephrectomy: Analysis of survival and prognostic factors. *Br J Urol* 1992;70:125-134.
2. Volm M, Kastel M, Mattern J, Efferth T. Expression of resistance factors (P-glycoprotein, glutathione S-transferase and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer* 1993; 71: 3981-7.
3. Nishiyama K, Shirahama T, Yoshimura A, Sumizawa T, Furukawa T, Ichikawa-Haraguchi M. Expression of the multidrug transporter, (P-Glycoprotein in renal and transitional cell carcinomas. *Cancer* 1993; 71:3611-9.
4. Kojima K, Nauro S, Kanayama H, Kagawa S. Evaluation of Ki-67 antigen using MIB1 antibody as a prognostic factor in renal pelvic and ureteral cancer. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1996; 87: 822-30.
5. Masuda M, Iki M, Tanako Y, Asakura T, Noguchi S, Ikeda I, Kubota Y, Hasaka M. Prognostic significance of Ki-67 labeling index in urothelial tumors of the renal pelvis and ureter. *J Urol* 1993; 20:193-203.
6. O'Toole K. M. Brown M, Hoffmann P. Pathology of benign and malignant kidney tumors. *Urol Clin North Am* 1993;149:174-178.
7. Mickisch GH, Pai LH, Siegsmond M, Campain J, Gottesman MM, Pastan I. Pseudomonas exotoxin conjugated to monoclonal antibody MRK 16 specifically kills multidrug resistant cells in cultured renal carcinomas and in MDR transgenic mice. *J Urol* 1993;149:174-178.
8. Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, Kelley DJ, Stambrook PJ, Gluckman JL. Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119:753-757.
9. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71:2454-60.
10. Fuhrman SA., Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655-663.
11. Hoskins J, DeHerdt SV, Moore RE, Bumol TF. The development and characterization of Vinca alkaloid-resistant Caco-2 human colorectal cell lines expressing mdr-1. *Int J cancer* 1993;53: 680-8.
12. Mizoguchi T, Yamada K, Furukawa T, Hidaka K, Hisatsugu T, Shimazu H, Tsuruo T, Sumizawa T, Akiyama S. Expression of the MDR1 gene in human gastric and colorectal carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 1990; 82:1679-83.
13. Chuman Y, Sumizawa T, Takebayashi Y, Niwa K, Yamada K, Haraguchi M, Furukawa T, Akiyama S, Aikou T. Expression of the multidrug-resistance-associated protein gene in human colorectal, gastric and non small cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 1996;66:274-279.
14. Kaudewitz P, Braun-Falco O, Ernst M. Tumor cell growth fractions in human malignant melanomas and the correlation to histopathologic tumor grading. *Am J Pathol* 1989;134:1063-1068.
15. Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY. Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathol* 1991;19:545-550.
16. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi M. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma: Comparison of Ki-67 immunohistochemical study. DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer* 1988; 65:1180-1184.