

Prostat Adenokarsinomlarında p 53 Ekspresyonu ile Gleason Skorlaması Arasındaki İlişki *

Dr. Filiz Özyılmaz¹, Dr. Vehbi Şeker¹, Dr. Latife Candan²,
Dr. Kemal Kutlu³, Dr. Esat Kaya⁴, Dr. Osman İnci⁵.

ÖZET

p 53 süpresör geninde meydana gelen mutatik değişiklikler son yıllarda bir çok malign tümörde tesbit edilerek bu mutasyona uğramış genin kanser gelişiminde önemli rol oynadığını kabul edilmektedir. Bu amaçla 44 prostat adenokarsinomunda p53 proteinini (monoklonal mouse, PAb 1801) immünohistokimyasal olarak çalışıp, sonuçları vakaların Kombine Gleason Skorları (KGS) ile kıyasladık. Vakalarımızın 3 ü düşük grade (KGS: 2-4), 15'i orta grade (KGS: 5-7), 26'sı yüksek grade (KGS: 8-10) olarak değerlendirildi. Bu grade'lemeye göre p53 pozitifliği : Düşük grade'de 0, orta grade'de 1, yüksek grade'de 8 vakada saptandı. Toplam olarak 44 vakanın 9'unda (% 20.4) değişik yoğunlukta p53 proteini pozitif bulundu. Sonuçta, prostat adenokarsinomlarında p53 pozitifliğinin literatür ile uyumlu olarak bulunduğu ve bunun tümör diferansiyasyonu ile ilişkili olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler : Prostat adenokarsinomu, p53, Gleason Grade

GİRİŞ

p53 proteini tüm memeli hücrelerince eksprese edilen ve muhtemelen hücre proliferasyonunu kontrol altında tutan bir nükleer fosfoproteindir (1-3). İntrasellüler yoğunluğu düşük ve yarı-ömrü çok kısa olduğu için normal hücrelerde immünohistokimyasal (IHK) olarak göstermek güçtür (1,4). p53 proteini 17. kromozomun kısa kolunda lokalize p53 geninin bir ürünüdür (3,5,6). Tümör baskılayıcı gen olan p53 geni inaktive olduğunda bu özelliğini yitirerek hücre transformasyonuna ve tümör gelişimine neden olmakta, yani onkogen gibi rol oynamaktadır. Bu inaktivasyonun, genin 5-8. eksonlarında meydana gelen bir mutasyon sonucunda olduğu belirtilmektedir (6-10). Mutasyona uğramış p53 geni, yarı ömrü çok daha uzun bir protein salgılar ve tümöral dokularda IHK olarak gösterilebilir (2-4, 11).

Son yıllarda, malign tümörlerin bir çoğunda p53 gen mutasyonu ve tümöral dokularda IHK olarak p53 proteini gösterilmiştir (1,4,11-16). Bazı çalışmalar p53 varlığının, tümör diferansiyasyonu, evresi ve prognozu ile ilişkili olduğunu (17-22), bazıla-

SUMMARY

THE CORRELATION OF THE p 53 EXPRESSION IN PROSTATIC ADENOCARCINOMAS WITH THE GLEASON SCORES

In recent years, the mutatic changes in p53 suppressor gene have been detected in many malign tumors and it has been accepted that this mutated gene plays an important role in the carcinogenesis. We immunohistochemically investigated p53 protein (mouse monoclonal, PAb 1801), which is the product of p53 gene, in 44 prostatic adenocarcinomas and we compared the results with the Combine Gleason Scores (CGS) of the cases. 3 of our cases were evaluated as low grade (CGS : 2-4), 15 of them were intermediate grade (CGS 5-7) and 26 of them were high grade (CGS: 8 - 10) According to GS, the results of p53 positivity were found as follows : 0 in low grade, 1 in intermediate grade and 8 in high grade. Totally, in 9 out of 44 cases (20.4 %) various expressions of p53 protein were found to be positive. We concluded that the positivity of p53 protein were found to be positive. We concluded that the formable with the positivity of p53 protein in prostatic adenocarcinomas is conformable with the literature and that this correlates with tumor differentiation.

Key Words : Prostatic adenocarcinoma, p53, Gleason

rı ise böyle bir ilişki olmadığını ileri sürmektedir (23,24).

Prostat kanserlerinde de p53 mutasyonunun kanıtlayan genetik analizler (9,25,26) ve IHK çalışmaları (7-9,13,18,19,22-24,27-31) doksanlı yılların başından bu yana giderek artmaktadır. Bu amaçla bölümümüzde tanı almış prostat adenokarsinomlarında p53 varlığının saptamak ve grade ile ilişkili olup olmadığını araştırmak istedik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya, 1985-1994 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji kliniğine müracaat edip Patoloji Bölümüne gelen doku örneği ile primer prostat adenokarsinomu tanısı almış 44 prostat kanseri vakası (Yaş:50-85, ortalama:69) alındı. Bunların 23'ü iğne biyopsisi, 19'u açık prostatektomi ve 1'i transüretral rezeksiyon materyali idi. Her vakaya ait formalin tespitli parafine gömülmüş materyal kullanıldı. Vakaların HE bo-

* Bu çalışma Trakya Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

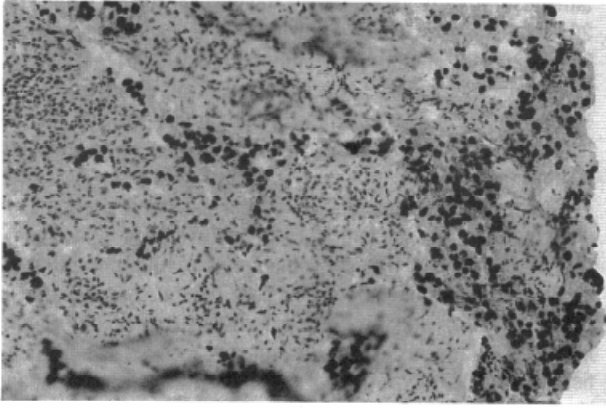
1 Yrd. Doç. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD/Edirne

2 Arş. Gör. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD/Edirne

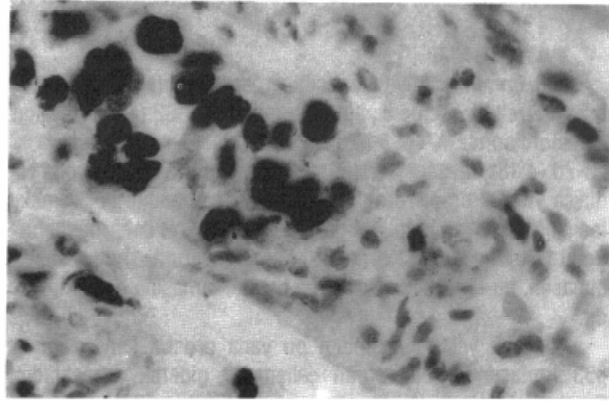
3 Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD/Edirne

4 Uzm. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD/Edirne

5 Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD/Edirne



Resim 1 : KGS 9 olan vakada, anti-p53 ile (++) boyanma dağılımı gösteren hücreler.



Resim 2 : İleri büyütmede nükleuslardaki yoğun p53 varlığı, X400.

KGS	n	GG	n
Skor 2	1	Düşük G	3
Skor 3	1		
Skor 4	1		
Skor 5	2	Orta G	15
Skor 6	4		
Skor 7	9		
Skor 8	12	Yüksek G	26
Skor 9	7		
Skor 10	7		
Toplam	44		

Tablo I : Vakaların Gleason Skorlaması

yalı preparatları Gleason Skorlamasına (32) göre derecelendirildi (Tablo I). Her vakada yeterli derecede tümör içeren ve en yüksek skoru gösteren alanı kapsayan bloktan elde edilen 5 mikronluk kesitler Super Sensitive Biotin -Streptavidin (SSB-SA) (33) metodu ile p53 monoklonal mouse antikorun hazır formu (BioGenex/San Ramon, CA. katalog no: Am240-5M) kullanılarak boyandı. Antijenik özelliği açığa çıkarmak için primer antikor damlatılmadan önce, kesitler 100 C lik mikrodalga fırında sitrat buffer solüsyonunda benmari usulü 10 dakika tutuldu. Kromojen olarak fast red kullanıldı. Önceden pozitifliği tespit edilmiş olan meme karsinomu dokusu pozitif kontrol, primer antikor damlatılmayan kesitler negatif kontrol olarak kullanıldı.

Değerlendirme yapılırken sadece nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Formalin tespitine bağlı olarak çeşitli nedenlerle ortaya çıktığı ve yanlışlığı olduğu bildirilen (4,12,16) sitoplazmik boyanma dikkate alınmadı. Ayrıca boyanmanın yaygınlığına bakıldı. Boyanan hücre oranı %10'dan az ise fokal (+), % 10-50 ise bölgesel (++) , %50 ve fazla ise diffüz (+++) olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler Fisher'in "exact test" ine göre yapıldı. Anlamlılık için P'nin 0.05'den küçük olması kriter alındı.

BULGULAR

GS Sisteminde KGS:2-4 olan grup düşük grade, KGS:5-7)

olan grup orta grade, KGS : 8-10 olan grup yüksek grade olarak alındı.(9,22,23). Vakalarımızı Gleason Grade (GG) Sistemi kriterlerine göre değerlendirdiğimizde düşük grade 3, orta grade 15, yüksek grade 26 vaka olduğu saptandı (Tablo I).

İmmünohistokimya sonuçları : 44 prostat adenokarsinomlu vakamızın 9'unda (%20.4) nükleer boyanma vardı. Bu 9 vakanın 4'ünde +, 3'ünde ++, 2'sinde +++ boyanma görüldü (Resim 1-2). Pozitif vakaların 5'i iğne biyopsisi, 4'ü açık prostatektomi materyali idi (Tablo II). KGS ile p53 pozitifliği kıyaslandığında düşük grade olan 3 vakanın hiç birinde boyanma olmadı. Orta grade 15 vakadan 1'inde (KGS-7), yüksek grade olan 26 vakadan 8'inde (KGS 8 olan 2 vaka, KGS 9 olan 3 vaka, KGS 10 olan 3 vaka) pozitif boyanma vardı (Tablo III).

İstatistiksel sonuçlar : Düşük grade de vaka sayısının az olması ve bu grupta boyanmanın olmaması nedeni ile vakalarımızı Tablo III'deki gibi 3 grade 'e ayırmak istatistiksel inceleme için uygun değildi. Bu yüzden literatürdeki bazı çalışmalarda (7,27) olduğu gibi vakaları düşük (KGS: 2-7) ve yüksek (KGS: 8-10) grade olmak üzere iki gruba (Tablo IV) ayırarak istatistiksel inceleme uygulandı. p53 pozitifliği ile GG arasında Fisher'in exact testi ile pozitif bir ilişki saptandı (p: 0.04). Vakaların primer GS'ları ve p53 birikimi arasındaki ilişkiye bakmak için, primer GS'u 1-3 olan grup (16 vaka) düşük skor, primer GS'u 4-5 olan grup 28 vaka) yüksek skor olarak kabul edilip (27) istatistiksel analiz uygulandı (Tablo V). Ancak anlamlı bir ilişki saptanmadı,

Tablo I I: p53 pozitif vakaların dökümü

Vaka	PGS	KGS	P53 yaygınlığı	Materyal
1	3	7	++	Prostatektomi
2	4	8	+	İğne Biyopsisi
3	4	8	+	İğne Biyopsisi
4	4	9	+	İğne Biyopsisi
5	4	9	++	Prostatektomi
6	4	9	++	Prostatektomi
7	5	10	+	İğne Biyopsisi
8	5	10	+++	Prostatektomi
9	5	10	+++	İğne Biyopsisi

PGS : Primer Gleason skor, KGS : Kombine Gleason skor.

(Fisher'in exact testi, p:0.07).

TARTIŞMA

p53 immünreaktivitesi çeşitli organ tümörlerinde gösterilmiştir. Özellikle meme kansinomlarında % 44-62 (11-13), kolon kansinomlarında % 46. 5-67 (11,16), akciğer kansinomlarında % 43-70 (4,13), mesane kansinomlarında % 54-87 (11,34) gibi oldukça yüksek oranlarda p53 reaktivitesi saptandığı bildirilmektedir. Prostat kansinomlarında ise bu oran çok daha düşüktür. Soini ve arkadaşları (13) prostat kansinomlarında oranın düşük olmasını, bu tümörlerin hormona duyarlı olmasına bağlamaktadır.

Doksanlı yılların başından bu yana prostat kanserlerinde p53 mutasyonunu araştıran çalışmalar giderek artmaktadır. Prostat adenokarsinomlarında, gen analizi ile p53 mutasyonunun araştıran çalışmalarda % 5.8-42 oranında gen anomalisi saptanmıştır (59,22,25,26). Yine prostat adenokarsinomlarda İHK olarak p53 proteininin pozitif bulan çalışmalar mevcuttur (7,9,13,18,19,21,22,24,27,29,31). Bu çalışmalara bakıldığında p53 ekspresyonu %2.3 ila %79 arasında değişen geniş bir oranı kapsamaktadır. Ancak çalışmaların çoğunda bu oran % 20'yi aşmamaktadır. Losi ve arkadaşları (28) 45 vakalık prostat kanseri serilerinde, 39 adenokarsinomun hiçbirinde p53 varlığı sap-

Tablo I II: Gleason Grade ve p53 pozitifliğinin kıyaslanması.

GG	n	p53 (+)	(%)
2-4	3	0	(0)
5-7	15	1	(6.6)
8-10	26	8	(30.7)
Toplam	44	9	20.4

Tablo I V : Gleason Grade ve p53 (+) kıyaslaması

GG	n	p53 (+)	(%)
2.-7 Düşük	18	1	5.5
8-10 Yüksek	26	8	30.7
Toplam	44	9	20.4
Fisher'in exact testi, p:0.04			

Tablo V : Primer GS ve p53 pozitifliğinin kıyaslanması.

Primer GS	n	p53 (+)	(%)
1-3	16	1	6.2
4-5	28	8	28.5
Toplam	44	9	
Fisher'in exact testi, p:0.07			

tamamıştır. Çalışmamızda p53 reaktivitesi 44 vakanın 9'unda (% 20.4) saptanmıştır. Bu oran yukarıda bahsedilen çalışmalar ile kıyaslandığında literatür ile uyumlu görülmektedir (Tablo VI). % 79 gibi yüksek oranda p53 pozitifliği bulan van Veldhuizen ve arkadaşlarının (29) çalışmalarında oranın bu denli yüksek olmasının nedeni muhtemelen sitoplazmik boyanmanın da pozitif kabul edilmesidir.

Soini ve arkadaşlarının (13) akciğer, meme ve prostat kanserlerinde yaptıkları toplam 143 olguluk çalışmada %34 oranında p53 ekspresyonu İHK olarak bulunmuş ve tümör grade'i yükseldikçe p53 pozitifliğinde de bir artış olduğu saptanmıştır. Bu bulgudan yola çıkarak biz de vakalarımızın GG ile p53 pozitifliğini kıyasladık. Grade yükseldikçe boyanma yüzdesinin arttığını istatistiksel (p:0.04) olarak gördük (Tablo IV). Kallakury ve arkadaşları (27) vakaların primer ve KGS ile p53 varlığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Biz olgularımızda primer GS ve p53 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptayamadık (Tablo V).

Aprikian (19) ve Navone (21) p53 pozitifliği ile hem KGS hem de stage arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır. Thomas ve arkadaşları (7) çalışmalarında KGS'u 8 ve üzeri olan vakalarında p53 pozitifliğini daha fazla bulmuşlardır. Visakorpi ve arkadaşları (18), Dünya Sağlık Örgütü Sistemi'ne göre grade'ledikleri 137 prostat kansinomunda, p53 immünreaktivitesinin yüksek gradeli tümörlerde daha fazla olduğunu vurgulamaktadır. Literatürde, p53 ile grade arasında anlamlı ilişki bulamayan çalışmalar da mevcuttur (31,35). Bookstein (22) ise p53 varlığının stage ile kuvvetli bir ilişkisi olduğunu göstermiştir. Ancak pozitiflik oranı ile GG arasında, istatistiksel olarak zayıf bir ilişki söz etmektedir. Yine aynı çalışmada, boyanmanın yaygınlığını ve şiddetini ayrı ayrı skorlayıp, bunların toplamını alarak bir İHK skoru oluşturulmuş ve gen anomalisi olan vakaların İHK skorlarının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada p53 proteini pozitif olan 19 vakanın 9'unda anormal gen (nokta mutasyonu) saptanmış, 20 negatif olgunun tümünde gen anomalisi olmadığı görülmüştür.

Prostat kansinomlarında yapılan İHK çalışmaların bazılarında, p53 proteininin dokuda boyanma özellikleri dağılım derecesi ve şiddeti açısından da incelenmiştir. (7,19,22,27). Thomas (7) ve Kallakury (27) nükleer boyanmayı dağılım derecesine göre diffüz, bölgesel ve fokal olarak sınıflamışlar, ancak bunun grade ya da stage ile ilişkisi üzerinde durmamışlardır. Aprikian (19), nükleer boyanmayı yoğunluğa göre hafif, orta, şiddetli, ayrıca dağılıma göre de 5 grupta (Boyanan hücre yüzdesine göre) olmak üzere incelemeye almıştır. Ancak boyanma özelliklerinin GS ile bağlantılı olmadığı görülmektedir. Sadece dikkat çeken nokta dağılım yüzdesi yüksek olan bir vakanın boyanma yoğunluğunun da şiddetli olmasıdır. Biz de vakalarımızda boyanma dağılımına baktığımızda GS ile arasında anlamlı ilişki saptayamadık (Tablo II).

Sonuç olarak, literatürde de vurgulandığı gibi prostat kansinomlarının gelişiminde p53 geni rol oynamaktadır, ancak diğer organ kanserlerindeki gibi daha düşük oranda rastlanılmaktadır. p53 varlığının KGS ile arasındaki pozitif ilişki nedeni ile hastalığın prognoz tayininde yararlı bir yöntem olabileceği düşüncesindeyiz. Bunun doğrulanabilmesi için çalışmanın devamı olarak vakalarımızın klinik veriler ile p53 sonuçlarının kıyaslanması yapılmaktadır.

ÇALIŞMA	Antikor	n	+ Vaka	(%)
Losi (28)	M	39	0	(0)
Voeller (9)	M	85	2	(2)
Soini (13)	P	34	2	(6)
Bookstein (22)	M,P	150	19	(13)
Thomas (7)	P	68	9	(13)
Kallakury (27)	M	107	15	(14)
Mellon (31) *	M	29	5	(17)
Visakorpi (18)	P	137	23	(17)
Aprikian (19)	M,P	93	19	(20)
van-Veldhuizen (29)	M	33	26	(79)
Özyılmaz	M	44	9	(20)
Toplam		819	129	(15.75)

M : Monoklonal, P : Poliklonal

* : Frozen kesit, diğerlerinde parafin kesit kullanılmış.

Tablo Vi : Prostat adenokarsinomlarında p53 reaktivitesi oranlarının karşılaştırılması.

KAYNAKLAR

- Roncalli M, Dolioni C, Springall Dr, Papotti M, Pagani A, Polak Jm. et al. Abnormal p53 expression in lung neuroendocrine tumors: Diagnostic and prognostic implications. *Diagn mol Pathol* 1992; 1 (2) : 129-37.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57 : 1083 - 93.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991 ; 351 : 453-6.
- Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990 ; 335 : 675-679.
- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986 ; 320 : 84-85.
- Nigro Jm, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup Jm, Hostetter R, Cleary K. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989 ; 342 : 705-708.
- Thomas DJ, Robinson M, King P, Hasan T, Charlton R, Martin J, Carr TW, DE. p53 expression and clinical outcome in prostate cancer. *Br J Urol* 1993 ; 72 : 778 - 81.
- Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Can Res* 1991 ; 51: 4716-20.
- Voeller HJ, Sugars LY, Pretlow T, Gelmann Ep. p53 oncogene mutations in human prostate cancer specimens. *J Urol* 1994 ; 151 : 492 - 495.
- Bennett WP, Hollstein MC, He A, Zhu SM, Resau JH, Trump BF, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 1991 ; 6 : 1779 - 1784.
- Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Lukas 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 - 1703.
- Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, et al. Patterns of expression of the p 53 tumour suppressor in human breast tissue and tumours in situ and in vitro. *Int J, Cancer* 1990 ; 46 : 839 - 844.
- Soini Y, Paakkö P, Nuorva K, Nuorva K, Kamel D, Lane DP, Vahakangas K. Comparative analysis of p53 protein immunoreactivity in prostatic, lung and breast carcinomas. *Virchows Archiv A pathol Anat* 1992 ; 421 : 223 - 228.
- Dalbagni G, Presti JC, Reuter VE, Zhang ZF, Sarkis AS, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. *Diagn Mol Pathol* 1993 ; 2 (1) : 4-13.
- Van den Berg FM, Tigges AJ, Schipper MEI, den Hartog-Jeger FCA, Kroes WGM, Walbloomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumours. *J Pathol* 1989 ; 157 : 193-199.
- Purdie CA, O. Grady J, Piris J, Wyllie AL, Bird CC. Rapid communication p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991 ; 138 (4) : 807-813.
- Isola J, Visakorpi T, Holli K, et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 : 1109-14.
- Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J. Small subgroup of aggressive, highly proliferative

- prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Natl Cancer Inst* 1992 ; 84 (11) : 883 - 7.
19. Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR, Zhang ZF, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Immunohistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 1994 ; 151 (5) : 1276 -1280.
 20. Macoska JA, Powell IJ, Sakr W, Lane MA. Loss of the 17p chromosomal region in a metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol* 1992 ; 147 (4) : 1142-1146.
 21. Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Goodrow TL, Palmer JL, Nichols WW, et al. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993 ; 85 (20) : 1657 -1669.
 22. Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC. p53 is mutated in subset of advanced- stage prostate cancers. *Cancer Res* 1993 ; 53 (14) :3369 - 3373.
 23. Berner A, Nesland JM, Waehre H, Silde J, Fossa SD. Hormone resistant prostatic adenocarcinoma. An evaluation of prognostic factors in pre- and Post-treatment specimens. *Br J Cancer* 1993 ; 68 (2) 380-384.
 24. Vesalainen SL- Lipponen PK, Talja MT, Alhava EM, Syrjanen KJ. Proliferating cell nuclear antigen and p53 expression as prognostic factors in T1-20 prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1994 ; 58 (2) ; 303-308.
 25. Effert PJ, McCoy RH, Walther PJ, Liu ET. p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J Urol* 1993 ; 150 : 257-261.
 26. Chi SG, deVere-White RW, Meyers FJ, Siders DB, Lee F, Gumerlock PH. p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *J Natl Cancer Inst* 1994 ; (12) : 926-933.
 27. Kallakury BVS, Figge J, Ross JS, Fisher HAG, Figge HL, Jennings TA. Association of p53 immunoreactivity with high Gleason tumor grade in prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994 ; 25 : 92-97.
 28. Losi L, Di Gregorio C, Braiusi M, Fante R, Hurlimann J. Expression of p53 in prostate cancers of different histologic types. *Path Res Pract* 1994; 190: 384-388
 29. Van-Veldhuizen PJ, Sadasivan R- Garcia F, Austenfeld MS, Stephens RL. Mutant p53 in prostate carcinoma. *Prostate* 1993 ; 22 (1) : 23-33.
 30. Thompson SJ, Mellon K, Charlton RG, Marsh C, Robinson M, Neal DE. p53 and Ki-67 immunoreactivity in human prostate cancer and benign hyperplasia. *Br J Urol* 1992 ; 69 (6) : 609 -613.
 31. Mellon K, Thompson S, Charlton RG, Marsh C, Robinson M, Lane DP. et al. p53, c-erb -2 and the epidermal growth factor receptor in the benign and malignant prostate. *J Urol* 1992 ; 147 : 496-499.
 32. Gleason DF. Histologic grading of prostatic carcinoma (Chp.6). Bostwick DG. Pathology of the prostate 1990. Churchill Livingstone, 83-93.
 33. Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:1599-1604
 34. Wright C, Mellon, K Johnston P, Lane DP, Harris AL, Horne CH, Neal DE. Expression of mutant p53, c-erb-2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br J Cancer* 1991 ; 63 (6) : 967-970.
 35. Foster CS, McLoughlin J, Bashir I, et al. Markers of the metastatic phenotype in prostate cancer. *Hum Pathol* 1992 ; 23 : 381-394.