

V. Soukup¹, M. Babjuk^{1,2}, J. Dušková^{2,3},
M. Pešl¹, J. Dvořáček^{1,2}, C. Povýšil^{2,3}

¹Urologická klinika 1. LF UK a VFN Praha

²katedra urologie IPVZ, Praha

přednosta prof. MUDr. J. Dvořáček, DrSc.

³Patologický ústav 1. LF UK a VFN Praha
přednosta prof. MUDr. C. Povýšil, DrSc.

IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE MIKROVASKULÁRNÍ DENZITY VE TKÁNI POVRCHOVÝCH NÁDORŮ MOČOVÉHO MĚCHÝŘE, VZTAH MIKROVASKULÁRNÍ DENZITY A JADERNÉ AKUMULACE p53

KLÍČOVÁ SLOVA

povrchové nádory močového měchýře
imunohistochemická detekce
mikrovaskulární denzita
gen p53
nádorová angiogeneze

SOUHRN

Cílem naší studie je posoudit prognostický význam mikrovaskulární denzity ve tkáni povrchových nádorů močového měchýře a zhodnotit vztah mezi mikrovaskulární denzitou a jadernou akumulací p53. Soubor této prospektivní studie tvořilo 61 pacientů s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře. Pacientům byly odebrány vzorky a imunohistochemicky byl prokazován CD34. Takto barvené preparáty byly vyhodnocovány v obrazové analytickém systému LUCIA. Sledovanými znaky byla průměrná relativní plocha cév na 1/12 mm² a maximální relativní plocha cév na 1/12 mm². Protein p53 byl detekován pomocí monoklonální protilátky DO-1. K interpretaci nálezů byla použita semikvantitativní metoda McCartyho, intenzita p53–pozitivity byla vyčíslena jako tzv. HSCORE. Všichni pacienti byli sledováni (18–48 měsíců) a léčeni dle obvyklých schémat. Výsledky byly hodnoceny pomocí statistického systému SAS (Cary, USA). V průběhu sledování byla zaznamenána recidiva onemocnění u 39 sledovaných. U 9 z nich došlo k progresi malignity do formy invazivního tumoru. Souvislost mezi mikrovaskulární denzitou, maximální mikrovaskulární denzitou a recidivou tumoru prokázána nebyla. Byla zjištěna statisticky nevýznamná souvislost mezi zvýšenou mikrovaskulární denzitou a rizikem progresse onemocnění. Statisticky významná se naopak v našem souboru ukázala korelace HSCORE s CD34–mikrovaskulární denzitou ($p < 0,0493$). Lze konstatovat, že kvantita imunohistochemického vyšetření mikrovaskulární denzity může být pomocným prognostickým faktorem u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře. Podle našich výsledků lze předpokládat určitou roli p53 v regulaci angiogeneze povrchových uroteliálních karcinomů.

KEY WORDS

superficial carcinomas of urinary bladder
immunohistochemical detection
microvascular density
p53 gene
cancer angiogenesis

SUMMARY

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF MICROVASCULAR DENSITY IN THE TISSUE OF SUPERFICIAL CANCERS OF URINARY BLADDER, THE RELATION BETWEEN THE MICROVASCULAR DENSITY AND THE p53 NUCLEAR ACCUMULATION

The object of our study is to evaluate the prognostic significance of microvascular density and the p53 nuclear accumulation. In the set of this prospected study there were involved 61 patients with superficial urothelial urinary bladder cancer. The samples were withdrawn from the patients and CD34 was immunohistochemically proved there. Such coloured preparations were evaluated in the image analysis system LUCIA. The features observed were the average relative vascular area on 1/12 mm² and the maximal relative vascular area on 1/12 mm².

The P53 protein was detected by means of monoclonal antibody DO-1. McCarty's semi-quantitative method was used for the interpretation of the finding, the p53-positivity intensity was figured out as so-called HSCORE. All the patients were observed (18–48 months) and treated according to the common schemes. The results were evaluated by means of SAS statistic system (Cary, USA). During the observation there was recorded the relapse of the disease in 39 observed patients. At 9 of them the malignity progressed into the form of invasive tumour. The relation between the microvascular density, maximal microvascular density and the relapse of disease was not proved. There was found a statistically insignificant relation between the increased microvascular density and the risk of the disease progression. On the contrary, to be statistically significant turned out the correlation of HSCORE with CD34–microvascular density ($p < 0,0493$). It can be stated that the quantity of immunohistochemical examination of microvascular density may be a supplementary prognostic factor at the patients with the superficial urothelial carcinoma of urinary bladder. According to our results a certain role of p53 in the regulation of angiogenesis of superficial urothelial carcinomas can be presumed.

ÚVOD

Typickým rysem povrchových nádorů močového měchýře jsou jejich četné recidivy spojené s rizikem progresí onemocnění. Velká pozornost je proto věnována nejrozličnějším prognostickým faktorům, které se snaží předpovědět budoucí chování malignity. Jedním z takových prognostických faktorů je i míra angiogeneze, vyjadřovaná jako mikrovaskulární denzita.

Angiogeneze obecně je proces vzniku nové kapilární sítě z preexistujících cév. Fyziologicky se vyskytuje v embryogenezi nebo při hojení ran [1]. Nádorová angiogeneze je důležitá nejen pro progresivní nádorový růst, ale rovněž usnadňuje proces metastazování [2-4]. Doposud bylo identifikováno několik angiogenních růstových faktorů (endoteliální růstový faktor, bazický fibroblastový růstový faktor, tymidin fosforyláza, transformující růstový faktor - TGF α a β), které jsou exprimovány maligními buňkami a působí vznik nové kapilární sítě z kapilár přítomných v přilehlém hostitelském stromatu. K této novotvořené síti kapilár se připojují nádorové buňky, po proteolýze bazální membrány, migraci a intravazaci dochází ke vzniku metastáz [5]. Z toho vyplývá, že by měl existovat lineární vztah mezi počtem vznikajících metastáz a počtem nádorových buněk, které se dostanou do oběhu, jež je závislý právě na nádorové vaskulární denzitě [6].

Prognostická hodnota angiogeneze je u různých typů nádorů zkoumána od doby, kdy Weidner popsál, že vysoké vaskulární skóre je spojeno se vznikem vzdálených metastáz [7]. Metodou, která kvantifikuje nádorovou angiogenezi uvnitř nádoru, je stanovení tzv. mikrovaskulární denzity (MVD). Principem je identifikace míst v nádoru s vysokou hustotou cév pod mikroskopem (tzv. hot spots) a stanovení maximální mikrovaskulární denzity. Tento způsob je výhodnější než vyšetřování mikrovaskulární denzity v náhodně vybraných místech tumoru, neboť rozsah neovaskularizace uvnitř nádoru bývá rozdílný, přitom místa s největší angiogenezí se nacházejí typicky v růstových zónách nádoru, zatímco nízká mikrovaskulární denzita bývá v centrálních, nekrotických oblastech nádoru [7-8]. Kvantitativní vztah mezi nádorovou angiogenezí a prognózou byl zjištěn u řady lidských nádorů, mezi něž patří karcinom prsu, prostaty, plic a maligní melanom [9-12]. Obecně platí, že fenotyp nádoru s větší vaskulární denzitou je spojen s méně příznivou prognózou [13]. Řadou recentních studií bylo prokázáno, že zvýšená mikrovaskulární denzita ve tkáni invazivního uroteliálního karcinomu je nezávislým prognostickým faktorem pro progresi karcinomu a nádorově specifické přežití a koreluje s vyšší incidencí lymfatických metastáz [14-16]. Zvýšená mikrovaskulární denzita může pomoci identifikovat nemocné s invazivním uroteliálním karcinomem, kteří by byli vhodnými kandidáty k adjuvantní chemoterapii [14,15,17].

Prognostická hodnota mikrovaskulární denzity u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře je nejasná. Určení míst s maximální mikrovaskulární denzitou je pro papilární morfolonii povrchového uroteliálního karcinomu obtížné [18]. Doposud bylo provedeno pouze několik studií zabývajících se prognostickým významem stanovení mikrovaskulární denzity u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře a v žádné nebyla zaznamenána signifikantní korelace mezi recidivou a progresí nádoru a mikrovaskulární denzitou [18,19].

Přestože bylo navrženo několik mechanismů, kterými by mohly být nádorové endoteliální buňky regulovány, přesný mechanismus není stále znám. Předpokládá se vliv tumor-supresorových genů [20,21].

Nádorový supresorový gen p53 může například regulovat stupeň nádorové angiogeneze pro svou schopnost kontrolovat produkci trombospodinu-1, účinného inhibitoru růstu endoteliálních buněk. Bylo zjištěno, že p53 zvyšuje tvorbu trombospodinu-1 ve fibroblastech. Ztráta genu p53 je spojena se vznikem angiogenního fenotypu tumoru a následným nárůstem agresivního chování, což svědčí pro možný vliv p53 na angiogenezi [22]. Vztah mezi mikrovaskulární denzitou a jadernou p53-akumulací byl prokázán u invazivního karcinomu močového měchýře [14-16]. U povrchového karcinomu se tímto vztahem zabývalo pouze minimum studií a souvislost mezi mikrovaskulární denzitou a p53 byla nevýznamná [19].

Cílem naší studie je posoudit četnost mikrovaskulární denzity pomocí imunohistochemického průkazu CD34 ve tkáni povrchových nádorů močového měchýře, respektive uvážit prognostický význam tohoto ukazatele a dále posoudit vztah mikrovaskulární denzity a mutace genu p53, zjišťované nepřímo imunohistochemicky průkazem proteinu p53 u stejného souboru nemocných.

MATERIÁL A METODIKA

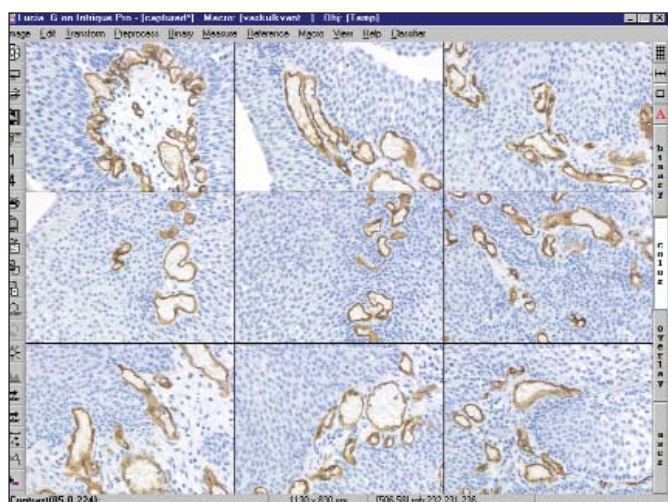
V rámci prospektivní studie byly vyšetřeny vzorky tkáně povrchových nádorů močového měchýře od 61 pacientů. Charakteristika souboru je uvedena v tab. 1.

distribuce pohlaví	14 žen, 47 mužů
věk	36 – 90 let (průměrný 67,7 roku)
délka sledování	18 – 48 měsíců (průměrné 28,4 měsíce)
předchozí anamnéza	31 prvozáchyt nádoru, 30 recidiva
TNM klasifikace	40 Ta, 21 T1
histologická diferenciac	21 G1, 35 G2, 5 G3

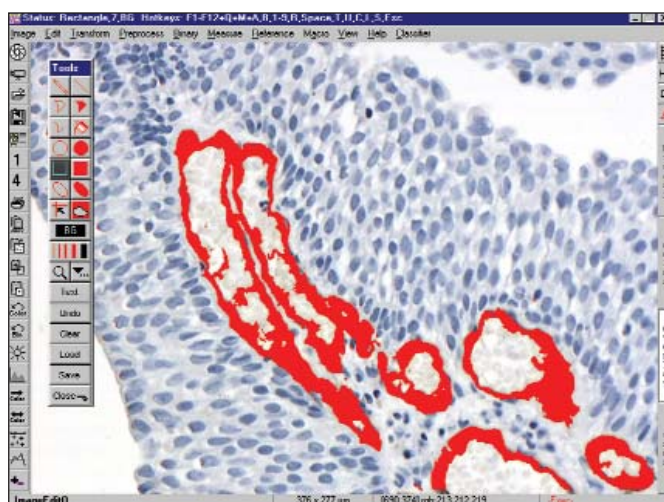
Tab. 1. Charakteristika souboru.

Všichni pacienti měli předoperačně sterilní moč. Pro hodnocení mikrovaskulární denzity byl použit formol-parafinový materiál uroteliálních karcinomů. V histologických řezech z parafinových bloků o tloušťce 4 μ m byly imunohistochemicky prokázány endotelie pomocí monoklonální protilátky proti CD34 firmy Immunotech (obr. 1). Na preparátech byla následně vyhledána (zvětšeno 40 $\times$) místa s nejvyšší vaskulární denzitou (tzv. hot spots). 12 zorných polí ve 200násobném zvětšení z každého vyšetřovaného preparátu bylo uloženo jako obrazová databáze v systému LUCIA (Laboratory Universal Computer Image Analysis) - Laboratory imaging, Praha. Použit byl mikroskop Microphot FXA, PlanApo 20 $\times$ 1, 9V a RGB kamera JVC TK 1070E. Plocha 1 obrazu ve zvětšení 20 $\times$ 10 = 103 586 μ m². Použitý rozsah měření na 12 obrazech znamenal vyšetření přibližně 1 mm² nádorové plochy (s výjimkou interpapilárních úseků, které byly vyloučeny pomocí binární masky užit v měření). Pomocí uživatelského programu v systému LUCIA byla vyhodnocena mikrovaskulární denzita (obr. 2-4). Sledovanými znaky byly celková plocha nádoru, průměrná relativní plocha cév na 1/12 mm², maximální relativní cévní plocha na 1/12 mm².

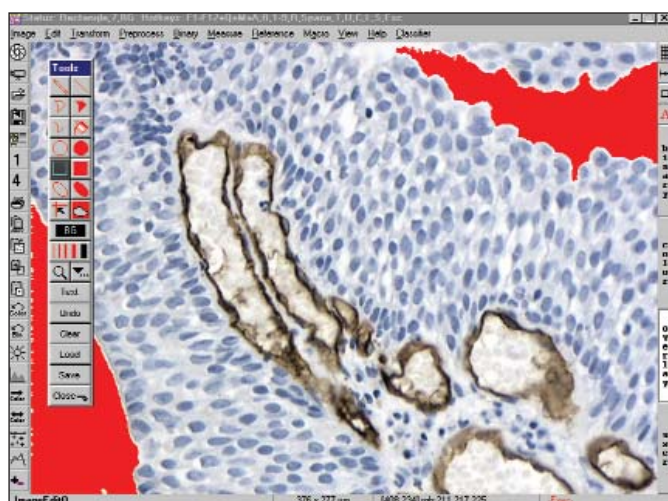
K detekci proteinu p53 byla použita protilátka DO-1. Při určování pozitivního zbarvení byla hodnocena pouze jaderná imunoreaktivita. Vyšetřováno bylo vždy minimálně 200 nádorových jader v několika reprezentativních polích. K interpretaci nálezů byla použita metoda McCartyho v modifikaci podle Bacusové. Tento postup usiluje o vyšší stupeň objektivity využitím počítačové techniky. Jde o semikvantitativní metodu, která bere v úvahu nejen



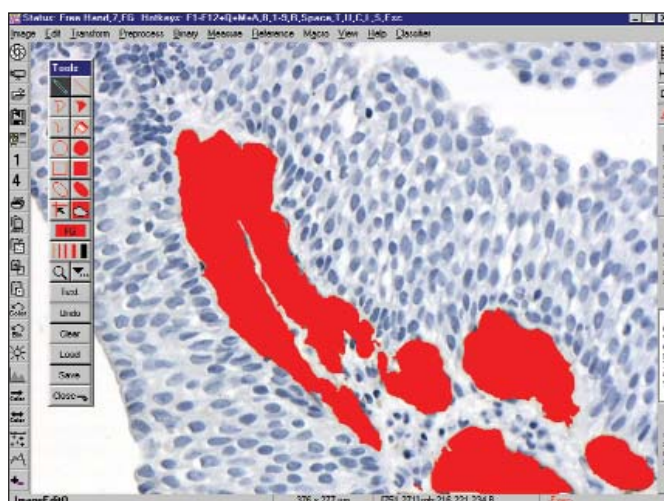
Obr. 1. Imunohistochemické zobrazení endotelu pomocí monoklonální protilátky proti CD34.



Obr. 3. Vyhodnocení mikrovaskulární density pomocí uživatelského programu v systému LUCIA - zobrazení obvodu cév.



Obr. 2. Vyhodnocení mikrovaskulární density pomocí uživatelského programu v systému LUCIA - odstranění interpapilárních úseků.



Obr. 4. Vyhodnocení mikrovaskulární density pomocí uživatelského programu v systému LUCIA - zobrazení plochy cév.

procento pozitivních nádorových buněk, ale rovněž intenzitu positivity kvantifikovanou do 4 stupňů (0 - negativní, 1- slabě pozitivní, 2 - pozitivní distinktně, 3 - pozitivní silně). Vyčísluje se tzv. HSCORE, přičemž $HSCORE = \sum P(i + 1)$, kde i je některý ze 4 výše uvedených stupňů a P kolísá od 0 do 100 %. Výsledkem je číselný údaj dosahující hodnot od 100 do 400. Zcela negativní nález má hodnotu HS 100, nejvyšší možnou hodnotou je pak HS 400. Zpracované preparáty byly zobrazeny v obrazové analytickém systému LUCIA na obrazovce a pomocí programu bylo zařazeno do příslušné skupiny minimálně 200 nádorových jader v několika reprezentativních polích. Hraniční hodnota byla stanovena na HS 200.

Všichni pacienti byly poté sledováni podle obvyklých schémat zahrnujících pravidelné cystoskopické a cytologické kontroly. Intravezikální chemoterapie nebo imunoterapie byly indikovány podle obvyklých kritérií.

STATISTICKÉ HODNOCENÍ

Veškerá statistická analýza byla vypracována pomocí systému SAS (Statistical Analysis System, SAS version 8.2, SAS Inc, Cary, NC,

USA). Funkce přežití bez návratu choroby a časy do progresu byly porovnány pomocí Log-Rank testu a Wilcoxonova zobecněného testu.

Metoda dle Kaplan-Meiera (zvaná též product limit method) byla užita pro odhad funkcí přežití.

Porovnání středních poloh 2 distribucí bylo provedeno pomocí ANOVA-testu, nebo dle Wilcoxonova nepárového testu. Souvislost mezi nominálními parametry byla testována χ^2 -kvadrát testem. Všechny testované hypotézy byly oboustranné a předem byla zvolena hladina významnosti $\alpha = 0,05$. Všechny testované hypotézy H_0 vs H_1 byly formulovány před sběrem dat, a nebyla užita žádná z metod adjustace pro mnohonásobná porovnávání.

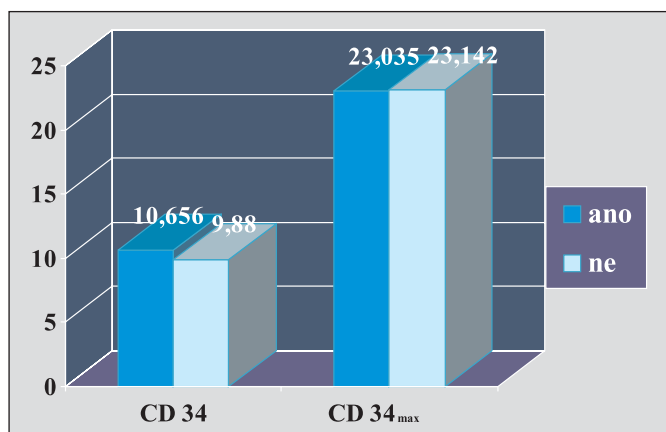
VÝSLEDKY

V průběhu sledování byla zaznamenána recidiva onemocnění u 39 (64 %) sledovaných. U 9 z nich (15 %) došlo k progresi malignity do formy invazivního tumoru. Průměrné hodnoty HSCORE a mikrovaskulární density zjišťované pomocí CD34 a jejich vztah k dalšímu průběhu onemocnění ukazuje tab. 2.

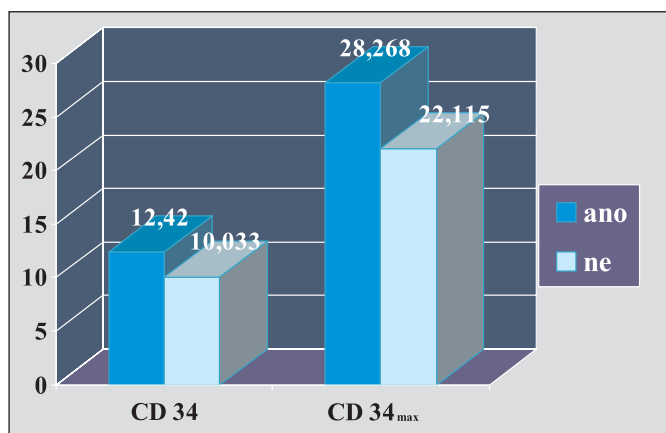
	Recidiva			Progrese		
	ano	ne	p	ano	ne	p
HS	224,56	194,51	< 0,0156	242,85	201,87	< 0,0075
CD34	10,656	9,88	< 0,53	12,42	10,033	< 0,1356
CD34 _{max}	23,035	23,142	< 0,9673	28,268	22,115	< 0,0630

Tab. 2. Průměrné hodnoty HSCORE a mikrovaskulární denzity zjištěvané pomocí CD34 a jejich vztah k dalšímu průběhu onemocnění.

Souvislost mezi mikrovaskulární denzitou, maximální mikrovaskulární denzitou a budoucí recidivou tumoru nebyla prokázána, jak je patrné z grafu (graf 5). Zaznamenali jsme určitou souvislost mezi zvýšenou mikrovaskulární denzitou a rizikem progresie onemocnění (graf 6 a Kaplanovy-Meierovy křivky na grafu 7 a 8). Ačkoliv tato souvislost nedosahovala pro CD34 i pro CD34_{max} statistické významnosti, byla při hodnocení vlivu maximální mikrovaskulární denzity (CD34_{max}) na riziko progresí získána p-value 0,0630, která by u většího souboru mohla být statisticky významná. Statisticky významná se v našem souboru ukázala korelace CD34 mikrovaskulární denzity s HSCORE ($r = 0,27$; $p < 0,0493$), což může svědčit pro určitou roli p53 v regulaci angiogeneze povrchových uroteliálních karcinomů. Korelace mikrovaskulární denzity CD34 a CD34_{max} s hloubkou nádorové invaze nebyla zazna-



Graf 5. Graf zobrazující vztah recidivy tumoru a CD 34, resp. CD 34_{max}.



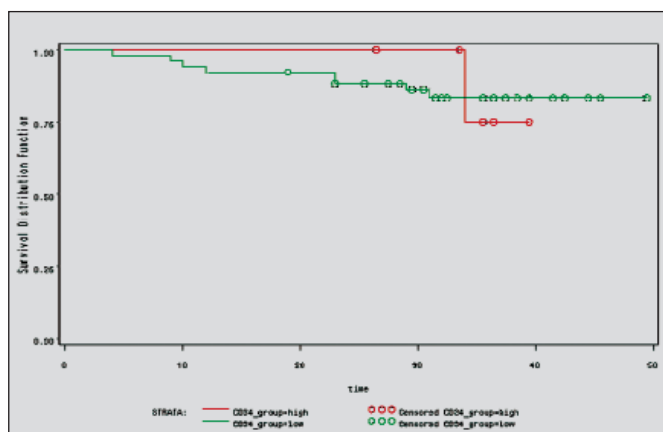
Graf 6. Graf zobrazující vztah progresie tumoru a CD 34, resp. CD 34_{max}.

menána ($p < 0,1678$, resp. $p < 0,4930$). Stejně korelace mikrovaskulární denzity CD34 a CD34_{max} s mírou histologické diferenciace nebyla patrná ($p < 0,0739$, resp. $p < 0,1015$).

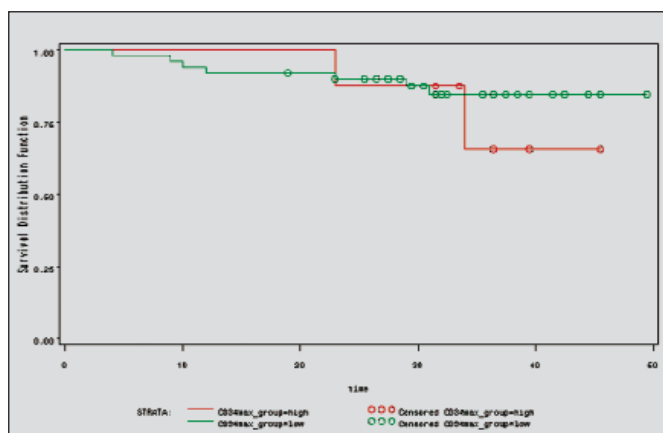
DISKUSE

Řadou recentních studií bylo prokázáno, že zvýšená mikrovaskulární denzita ve tkáni invazivního uroteliálního karcinomu je nezávislým prognostickým faktorem pro progresi karcinomu a nádorově specifické přežití [14–16]. Nicméně prognostická hodnota stanovení mikrovaskulární denzity u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře zůstává stále nejasná. Jedním z důvodů je fakt, že metodika stanovení mikrovaskulární denzity nebyla doposud standardizována, což znesnadňuje srovnávání jednotlivých studií a určení jejich důvěryhodnosti [23]. U povrchových papilárních karcinomů močového měchýře je navíc přesné hodnocení vaskularity obtížné, protože každá papilární struktura obsahuje svoje vlastní fibrovaskulární jádro, a je těžké určit, která část tumoru má být hodnocena [14]. Námí použité počítačové zpracování obrazu nám však umožnilo hodnotit mikrovaskulární denzitu i v preparátech z povrchových karcinomů močového měchýře.

Neovaskularizace se zřejmě v tumorigenezi karcinomu močového měchýře uplatňuje poměrně časně, pro což svědčí nález



Graf 7. Kaplanovy-Meierovy křivky pro progresi tumoru a CD 34.



Graf 8. Kaplanovy-Meierovy křivky pro progresi tumoru a CD 34_{max}.

při použití fluorescenční angiografie, který u papilárních karcinomů močového měchýře a rovněž u tumoru in situ zobrazuje zvýšenou vaskularitu [24]. Obecně platí, že porozumění regulaci nádorové angiogeneze má zásadní důležitost, neboť identifikace specifických environmentálních a genetických faktorů zodpovědných za regulaci neovaskularizace u kterékoli dané malignity usnadní vývoj nových léčebných strategií, které budou ovlivňovat vaskularitu nádoru. V případě povrchového karcinomu močového měchýře by měly vést ke snížení četnosti recidiv a progresí. Na fibrosarkomovém modelu bylo prokázáno, že inaktivace tumor–supresorového genu p53 vede k zvýšené produkci induktorů a snížené produkci inhibitorů, jejímž výsledkem je nastavení rovnováhy ve prospěch neovaskularizace [25]. Grossfeld prokázal asociaci mutace p53 se zvýšenou mikrovaskulární denzitou u nemocných s invazivním karcinomem močového měchýře [22]. V literatuře je opět pouze minimum studií zabývajících se souvislostí mezi p53 a mikrovaskulární denzitou u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem. Reiherem byla popsána nevýznamná korelace mezi mikrovaskulární denzitou určenou imunohistochemicky pomocí průkazu CD31 a CD34 a p53, z čehož bylo usuzováno, že p53 není primárním regulátorem angiogeneze v této populaci nemocných a že způsob regulace je na rozdíl od invazivních karcinomů měchýře odlišný [19]. Podle našich dat se zdá, že i u povrchového karcinomu močového měchýře je p53 jedním z možných faktorů, které regulují angiogenezi.

ZÁVĚR

Kvantita imunohistochemického vyšetření mikrovaskulární denzity u nemocných s povrchovým uroteliálním karcinomem močového měchýře může přinášet pomocnou prognostickou informaci. K definitivnímu určení významu mikrovaskulární denzity jako prognostického faktoru pro povrchový karcinom močového měchýře bude třeba provést rozsáhlejší studie. Statisticky významná souvislost mezi mikrovaskulární denzitou a jadernou akumulací p53 svědčí pro to, že p53 má určitou úlohu v regulaci nádorové vaskularizace u povrchového karcinomu močového měchýře.

Práce byla podpořena granty IGA MZ NC 8095-3/2004 a VZ MSM 111100005.

LITERATURA:

1. Folkman J. Clinical application of research of angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Am Int Med* 1971; 82: 96-100.

3. Bouck N, Stellmach V, Hsu S. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-141.
4. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Cancer Biol* 1992; 3: 65-69.
5. Effert P, Gastl G, Strohmeier T. Current and future strategies to block tumor angiogenesis, invasion, and metastasis. *World J Urol* 1996; 14: 131-140.
6. Liotta L, Kleiner J, Saidel G. Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974; 34: 997-1004.
7. Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl Med* 1991; 324: 1-8.
8. Offeren B, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density. *Eur J Cancer* 2003; 39: 881-890.
9. Weidner N, Carrol P, Flax J, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastases in invasive prostate carcinoma. *Amer J Path* 1993; 143: 401-409.
10. Weidner N, Folkman J, Pozza F. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887.
11. Barnhill R, Fandrey K, Levy M. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest* 1992; 67: 331-337.
12. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340: 145-146.
13. Wiedner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Path* 1995; 147: 9-19.
14. Dickinson A, Fox S, Persad R. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol* 1994; 74: 762-766.
15. Bochner B, Cote R, Wiedner N et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1603-1612.
16. Jeager T, Weidner N, Chew K et al. Tumor angiogenesis correlates with node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995; 154: 69-74.
17. Crew J, O'Brien T, Harris A. Bladder cancer angiogenesis, its role in recurrence, stage progression and as a therapeutic target. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15: 221-227.
18. Dinney C, Babkowski R, Antelo M et al. Relationship among cystectomy, microvessel density and prognosis in stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 1998; 160: 1285-1290.
19. Reiher F, Ozer O, Pins M et al. p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. *J Urol* 2002; 167: 1469-1474.
20. Rastinejad F, Polverini P, Bouck N. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 1989; 56: 345-355.
21. Dameron K, Volpert O, Tainsky M et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265: 1582-1584.
22. Grossfeld G, Ginsberg D, Stein J et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 219-227.
23. Vermuelen P, Gasparini G, Fox S et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32: 2474-2484.
24. Zimmern P, Laub D, Leach G. Fluorescein angiography of the bladder: technique and relevance to bladder cancer and interstitial cystitis patients. *J Urol* 1995; 154: 62-68.
25. Volpert O, Dameron K, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* 1997; 14: 1495-1501.

MUDr. Viktor Soukup
Urologická klinika 1. LF UK a VFN Praha
Ke Karlovu 6, 128 08 Praha 2