

M. Babjuk¹, J. Dušková², J. Dvořáček¹,
C. Povýšil¹, Z. Ibrahim¹, L. Jarolím¹, J.
Novák¹

¹Urologická klinika Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Katedra urologie IPVZ v Praze
Přednosta: prof. MUDr. J. Dvořáček, DrSc.

²Il. patologicko-anatomický ústav
1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice a Katedra patologie IPVZ v Praze
Přednosta: prof. MUDr. C. Povýšil, DrSc.

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMICKÉHO STANOVENÍ p53 VE TKÁNI POVRCHOVÝCH NÁDORŮ MOČOVÉHO MĚCHÝŘE

KLÍČOVÁ SLOVA:

Povrchové nádory močového měchýře
Prognostické faktory
Imunohistochemické stanovení p53
HSCORE.

SOUHRN:

Zhodnocení prognostických faktorů hraje významnou roli při volbě léčby u pacientů s povrchovými nádory močového měchýře. Často je v této souvislosti diskutována role genu a proteinu p53. Imunohistochemicky jsme stanovili p53 (protilátka BP53-12-1) v archivovaném materiálu 55 nemocných s povrchovými nádory močového měchýře a hodnotili prognostický význam tohoto vyšetření. Originálně jsme použili novou metodu interpretace nálezu, a sice semikvantitativní vyjádření pomocí HSCORE, které využívá počítačové techniky a bere v úvahu i intenzitu positivity jednotlivých buněčných jader. Za hraniční pro určení p53 positivity doporučujeme hodnotu HSCORE 200. Při použití této hranice recidivovalo 67,9 % p53 pozitivních nemocných a 19 % p53 negativních ($p < 0,01$), progredovalo 42,9 % s pozitivním nálezem oproti 9,5 % s nálezem negativním ($p < 0,05$).

KEY WORDS:

Superficial urinary bladder tumors
Prognostic factors
Imunohistochemic assessment of p53
HSCORE

SUMMARY:

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF p53 IN TISSUE OF SUPERFICIAL URINARY BLADDER TUMORS

The assessment of prognostic factors plays important role in treatment preference chosen for patients with superficial urinary bladder tumors. The role of gene and protein p53 is often discussed in those circumstances. In stored specimens from 55 patients with superficial tumors of the urinary bladder we have investigated the p53 (antibody BP53-12-1) by imunohistochemic technique and we have evaluated the prognostic value of such statement. Newly we used a new method of finding's interpretation, based on a semiquantitative assessment by HSCORE using the computer technologies combined with the intensity of every individual cellular nuclei positivity. As the cut off line for p53 positivity determination we recommend the HSCORE value 200. Using this cut off we have found disease recurrence in 67,9 % of p53 positive patients and in 19 % of p53 negative ($p < 0,01$), disease progression in 42,9 % of patients with positive and in 9,5 % with negative findings ($p < 0,05$).

ÚVOD:

Nádory močového měchýře představují nejčastější malignitu močového systému a jejich incidence v průmyslových zemích každoročně stoupá. Zhruba 70 - 80 % z celkového počtu tvoří povrchové uroteliální nádory, mezi které řadíme malignity klasifikované jako Ta, T1 a Tis dle TNM klasifikace (1). Je možné je odstranit transuretrální resekci, nemocného však ohrožují vznikem recidiv, jež se při dlouhodobém sledování objevují až v 88 % (2). V případě recidivy se můžeme dokonce setkat s progresí, tedy s přechodem nádoru do formy infiltrující, která je již spojena s bezprostředním rizikem vzniku metastáz. Přirozený průběh onemocnění je rozhodující pro osud nemocného (3). Jeho předpověď již v době diagnózy představuje základní a nejčastěji diskutovaný problém léčby povrchových nádorů močového měchýře. Dokonalá prognóza a odhalení nemocných s budoucí progresí umožní individuálně a včas volenou agresivní léčbu.

Rutině využívané prognostické ukazatele (histologická diferenciace nádoru, rozlišení Ta, T1 a Tis, četnost předchozích recidiv, plošný rozsah nádoru) sice odhadují agresivitu nádoru a zařazují jej do určité rizikové skupiny, neumožní však předpověď jeho konkrétního chování.

Na základě současných znalostí předpokládáme, že průběh maligního onemocnění je definován změnami genů, které buď potencují (onkogeny) nebo potlačují (tumor supresorové geny) nádorový růst. Jednou z nejčastějších genetických odchylek pozorovaných u nádorů močového měchýře jsou mutace a delecce v oblasti genu TP 53 (4,5). Tento tumor supresorový gen se významně uplatňuje při kontrole buněčného cyklu a ztráta jeho funkce proto může být podkladem neregulovaného nádorového růstu. Většina změn tohoto genu je provázena tvorbou patologického proteinu p53, který lze detekovat imunohistochemickým vyšetřením (5).

Cílem naší práce je na základě vyšetření archivovaného histologického materiálu diskutovat možnosti interpretace výsledků a prognostický význam imunohistochemického vyšetření p53 v tkáni povrchových nádorů močového měchýře.

MATERIÁL A METODIKA:

Soubor pacientů

K posouzení prognostického významu imunohistochemického stanovení p53 bylo do studie zařazeno 55 pacientů (36 mužů a 19 žen) sledovaných na naší klinice pro histologicky potvrzený povrchový papilokarcinom močového měchýře. Věk nemocných se v době studie pohyboval mezi 36 a 84 roky, průměrný věk činil 64,2 roku.

Tabulka č. 1: Charakteristika souboru

TNM/grade	Počet pacientů	Recidiva nádoru	Mnohočetný nádor	2 - 5 cm	Nad 5 cm
TaG1	4	3 (75 %)	3 (75 %)	2 (50 %)	0
TaG2	11	10 (90,9 %)	10 (90,0 %)	2 (18,2 %)	0
TaG3	3	3 (100 %)	2 (66,7 %)	3 (100 %)	0
T1G1	6	4 (66,7 %)	5 (83,3 %)	4 (66,7 %)	1 (16,7 %)
T1G2	14	7 (50 %)	11 (78,6 %)	5 (35,7 %)	4 (28,6 %)
T1G3	7	2 (28,6 %)	5 (71,4 %)	6 (85,7 %)	0
Tis	10	5 (50 %)	10 (100 %)		

K imunohistochemickému vyšetření byl použit transuretrálně získaný archivovaný histologický materiál. Transuretrální ošetření spočívalo v endoskopické resekci viditelných lézí a v odběru biotických vzorků ze suspektních ložisek. Na základě dokumentace o endoskopickém nálezu byly tumory rozděleny na solitární a mnohočetné a byl odhadnut plošný rozsah nádoru (u mnohočetných tumorů součet velikosti jednotlivých lézí). Nádory byly klasifikovány dle TNM klasifikace (verze z roku 1987) a stupně histologické diferenciace (dle stupnice WHO). Souhrnnou charakteristiku nádorů zařazených do studie přináší tabulka č. 1.

Do studie jsme zařadili pouze nemocné, kterým byla po transuretrální resekci nebo biopsii aplikována intravezikální imunoterapie BCG vakcínou. Soubor byl volen retrospektivně, a proto se v něm objevili i pacienti se solitárními nádory pTaG1, kteří by na základě dnešních znalostí k aplikaci BCG indikováni nebyli (6). K instilacím jsme použili dle již dříve publikovaného schématu preparát ImmuCyst obsahující kanadský kmen Connaught (7). Součástí dispenzarizačního programu byly pravidelné cystoskopické a cytologické kontroly. V případě podezření na recidivu nebo progresi onemocnění byli pacienti indikováni k cystoskopii v narkóze s resekci nebo "studenou" biopsií suspektních ložisek.

Pacienti byli sledováni 7 až 79 měsíců, průměrná doba sledování činila 34 měsíců.

Recidivy jsme zachytili u 23 sledovaných (41,8 %) 4 až 42 měsíců (průměrně 18,0 měsíců) po transuretrální resekci.

Progrese se objevila u 14 pacientů (25,5 %) po 10 až 40 měsících (průměrně 20,4 měsíce). V 6 případech byla provedena radikální cystektomie s derivací moči, ve 4 byla situace řešena opakovanou transuretrální resekci s následnou aktinoterapií nebo systémovou chemoterapií. Zbylí 4 pacienti byli vzhledem k věku, celkovému stavu a rozsahu nádoru v době recidivy léčeni pouze symptomaticky.

Celkem zemřelo v důsledku progrese onemocnění 6 pacientů (10,9 %) 20 - 52 měsíců (průměrně 32 měsíců) po úvodní transuretrální resekci.

Metodika zpracování preparátu a provedení imunohistochemického vyšetření

Zpracováván byl archivovaný materiál všech 55 nemocných zařazených do studie.

Řezy tkáně byly odparafinovány a zavodněny, antigen byl demaskován varem v tlakové nádobě v citrátovém pufru při pH 6 po dobu 5 minut. Po opláchnutí destilovanou vodou bylo ke každému preparátu přidáno neimunní sérum. Preparáty byly následně inkubovány přes noc při teplotě 40 °C s primární anti-p53 protilátkou a 3krát po 5 minutách opláchnuty v PBS pufru při pH 7,4 - 7,6. Dalším krokem bylo vyvolání peroxidázové reakce v DAB po dobu 10 - 20 minut

a trojnásobný oplach destilovanou vodou. Pro zesílení barevné intenzity bylo použito moření 3 - 5 % roztokem CuSO₄, následované dalším opláchnutím destilovanou vodou. Jádra byla dobarvena hematoxylinem po dobu 30 sekund, preparát byl opláchnut vodou a zamontován do kanadského balzámu.

K detekci proteinu p53 jsme použili protilátku BP53-12-1 (firma BioGenex). Jedná se o myši monoklonální protilátku reagující jak ve zmrazeném, tak ve fixovaném materiálu s původním i mutovaným proteinem p53 (8).

K vyhodnocení nálezu jsme použili optický mikroskop, přičemž za pozitivní zbarvení byla považována pouze jaderná imunoreaktivita. Hodnotili jsme vždy minimálně 200 nádorových jader v několika reprezentativních polích.

Velkou pozornost jsme věnovali interpretaci nálezu. Použili jsme v literatuře běžně uváděné hodnocení, kdy je počet pozitivních jader nádorových buněk uváděn v procentech. V rámci snahy o maximální objektivizaci jsme nově v této indikaci použili rovněž metodu McCartyho v modifikaci dle Bacusové (9). Tento postup usiluje o vyšší stupeň objektivizace využitím počítačové techniky. Navíc jde o semikvantitativní metodu, která bere v úvahu nejen procento pozitivních nádorových buněk, ale rovněž intenzitu positivity kvantifikovanou do čtyř stupňů:

- 0 - negativní
- 1 - pozitivní slabě, ale detekovatelný oproti negativnímu
- 2 - pozitivní distinktně
- 3 - pozitivní silně

Vyčísľuje se tzv. HSCORE dle následujícího vzorce:

$$\text{HSCORE} = \sum P_i (i+1),$$

kde je i některý ze 4 výše uvedených stupňů a P_i kolísá od 0 do 100 % (9).

Výsledkem je číselný údaj dosahující hodnot mezi 100 a 400, přičemž příslušnou hodnotu doplňujeme předponou HS. Zcela negativní nález tedy označíme jako HS 100, nejvyšší možnou pozitivní hodnotu pak HS 400.

Postup patologa lze charakterizovat následujícími kroky:

1. Preparát zpracovaný výše zmíněnou technikou je zobrazen v obrazově analytickém systému LUCIA na obrazovce.
2. Pomocí uživatelského programu je zařazeno do příslušné skupiny minimálně 200 nádorových jader v několika reprezentativních polích.
3. Výsledky jsou exportovány do programu Excel.
4. V předdefinované tabulce je vyčísleno HSCORE dle výše zmíněného vzorce.

HODNOCENÍ

Retrospektivně jsme hodnotili prognostický význam následujících faktorů:

1. Výsledek imunohistochemického vyšetření p53
2. Stupeň histologické diferenciace - GI, GII a GIII
3. Klasifikace dle TNM - Ta, T1 a Tis
4. Předchozí recidiva onemocnění - nádory primární, nádory sekundární
5. Četnost nádorů - nádory solitární, nádory mnohočetné
6. Plošný rozsah nádorů - nádory do 2 cm, nádory 2 - 5 cm a nádory větší než 5 cm

Za recidivu onemocnění považujeme opakovaný, histologicky prokázaný výskyt uroteliálního papilokarcinomu. Jako progresi hodnotíme nález uroteliálního papilokarcinomu infiltrujícího svalovinu detruzoru (T2 a více dle TNM klasifikace).

Statistický význam jednotlivých faktorů pro předpověď recidivy a progresu onemocnění byl zhodnocen pomocí chi-kvadrát testu. V případech, kde pro malé četnosti souboru nebylo možno chi-kvadrát test aplikovat, byl použit Fischerův přesný test. K posouzení četnosti pacientů bez recidivy a progresu v závislosti na výsledku p53 a délce sledování byla použita metoda dle Kaplan - Meiera.

VÝSLEDKY:

Z celkového počtu 55 imunohistochemicky zpracovaných preparátů bylo možno u 49 výsledků bezpečně zhodnotit. Pouze v 6 případech (4x Tis, 1x TaG1, 1x T1G2) byl vzorek tkáně příliš malý na spolehlivé posouzení nálezu.

Tabulka č. 2: Výsledky imunohistochemického vyšetření p53 (procentuální vyjádření) v závislosti na stupni histologické diferenciace

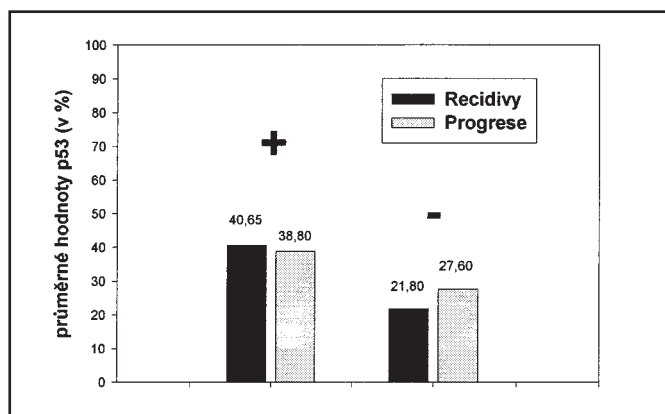
P53 v %	G1	G2	G3	Celkem
0 - 4 %	3	8	2	13 (26,5 %)
5 - 19 %	1	4	2	7 (14,3 %)
20 - 49 %	2	9	5	16 (32,7 %)
50 - 100 %	3	3	7	13 (26,5 %)
Celkem	9	24	16	49 (100,0 %)

Tabulka č. 3: Výsledky imunohistochemického vyšetření p53 (vyjádření dle HSCORE) v závislosti na stupni histologické diferenciace

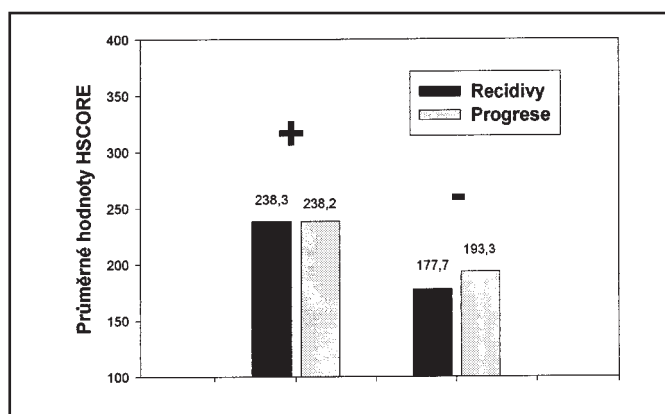
P53 (HS)	G1	G2	G3	Celkem
100 - 149	2	11	4	17 (34,7 %)
150 - 199	2	1	1	4 (8,2 %)
200 - 249	3	6	2	11 (22,4 %)
250 - 400	2	6	9	17 (34,7 %)
Celkem	9	24	16	49 (100 %)

Výsledek imunohistochemického vyšetření byl interpretován jak klasickým způsobem, tak pomocí HSCORE. Distribuce výsledků a její vztah k stupni histologické diferenciace nádoru je patrný z tabulek č. 2 (pro procentuální vyjádření) a č. 3 (pro vyjádření dle HSCORE). V obou případech byl zřejmý trend směřující k vyšším hodnotám u špatně diferencovaných nádorů, tato závislost však nebyla statisticky významná. Výsledek p53 nekoreloval ani s TNM klasifikací nádoru (konkrétní výsledky nejsou uvedeny).

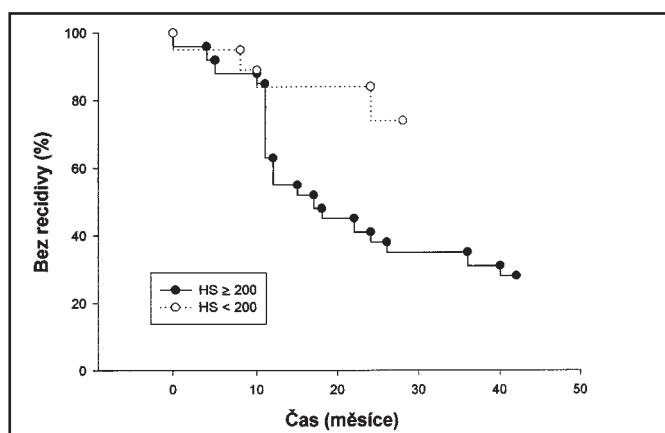
Hlavním cílem naší práce bylo posoudit prognostický význam imunohistochemického stanovení p53. Srovnali jsme průměrné hodnoty u pacientů s recidivou onemocnění s průměrnými hodnotami nemocných bez recidivy a stejné srovnání bylo provedeno rovněž pro skupiny s progresí a bez progresu onemocnění. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích č. 1 (pro procentuální



Obr. č. 1: Průměrné hodnoty p53 (vyjádření v procentech pozitivních buněk) u pacientů s recidivou, respektive progresí onemocnění (sloupce označeny znaménkem +) a u pacientů bez recidivy, respektive progresí (znaménko -). Rozdíl byl statisticky významný pro recidivy ($p < 0,05$), nikoliv však pro progresi onemocnění. K srovnání hodnot byl použit mediánový test.



Obr. č. 2: Průměrné hodnoty p53 (vyjádření v HSCORE) u pacientů s recidivou, respektive progresí onemocnění (sloupce označeny znaménkem +) a u pacientů bez recidivy, respektive progresí (znaménko -). Rozdíl byl statisticky významný pro recidivy ($p < 0,01$) i pro progresi onemocnění ($p < 0,05$). K srovnání hodnot byl použit mediánový test.



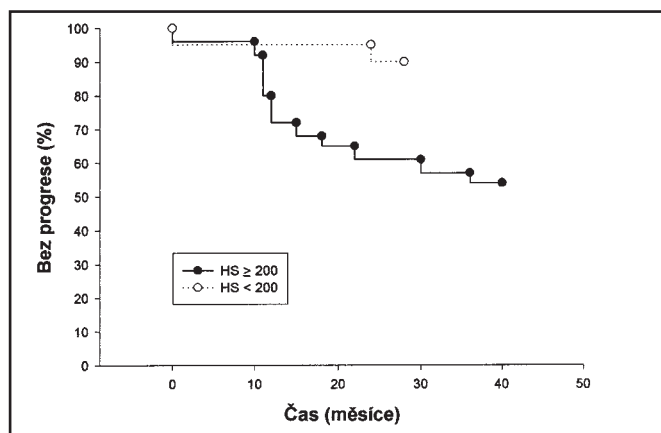
Obr. č. 3: Beznádorové přežití kalkulované dle Kaplan - Meierovy metody srovnávající p53 pozitivní a negativní pacienty. Za p53 pozitivní je považována hodnota HS 200 a více. Křivky byly statisticky testovány pomocí Mantel - Haenszelova testu a jejich rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,01$)

vyjádření) a č. 2 (pro vyjádření pomocí HSCORE). Ve skupinách s recidivou i progresí onemocnění jsou patrné vyšší hodnoty, statistické zpracování dat ukázalo významnější rozdíl v případě vyjádření pomocí HSCORE.

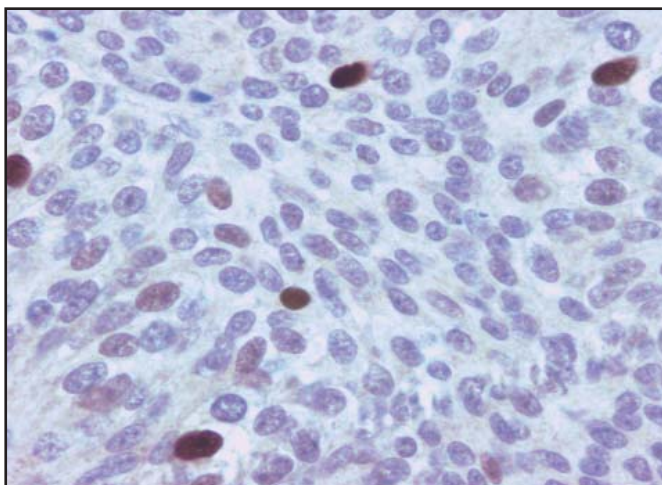
Pro klinickou aplikaci metody je nezbytné stanovit optimální hraniční hodnoty, při jejichž překročení je vzorek již považován za p53 pozitivní. Postupně jsme volili jako hraniční hodnoty 5 %, 10 %, 20 % a 50 % p53 pozitivních jader a statisticky posuzovali prognostický význam v jednotlivých případech. Statisticky nejvýznamnějších výsledků pro předpověď recidivy i progresí onemocnění bylo dosaženo při použití hodnoty 20 %. Obdobně jsme postupovali i u HSCORE, kde byly jako prahové použity hodnoty HS 150, 200 a 250. Statisticky se jako optimální hraniční hodnota jeví HS 200. Při použití této hranice recidivovalo 67,9 % p53 pozitivních nemocných a 19 % p53 negativních ($p < 0,01$), progredovalo 42,9 % s pozitivním nálezem oproti 9,5 % s nálezem negativním ($p < 0,05$).

Obrázky č. 3 a 4 obsahují Kaplan-Meierovy křivky pro recidivy, respektive progresi onemocnění u nemocných p53 pozitivních a negativních při použití prahové hodnoty HS 200. Je zřejmé, že průkaz p53 positivity byl za těchto podmínek nepříznivým faktorem pro předpověď recidivy i progresí nádoru.

Z ostatních hodnocených faktorů měl prognostický význam pouze stupeň histologické diferenciace pro předpověď progresí onemocnění, kdy progreduje 45 % nádorů GIII oproti pouhým 12 % GI a 20 % GI ($p < 0,05$). Počet předchozích recidiv, TNM klasifikace, počet tumorů i jejich plošný rozsah neměly vliv na budoucí recidivy ani na progresi onemocnění.



Obr. č. 4: Přežití bez progresí onemocnění kalkulované dle Kaplan - Meierovy metody srovnávající p53 pozitivní a negativní pacienty. Za p53 pozitivní je považována hodnota HS 200 a více. Křivky byly statisticky testovány pomocí Mantel - Haenszelova testu a jejich rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,01$)



Obr. č. 5: Uroteliální karcinom GII. Výrazná pozitivita ojedinělých jader v imunohistochemickém průkazu p53.

DISKUSE:

Gen TP53 se stal středem zájmu ve chvíli, kdy bylo zjištěno, že jeho anomálie se vyskytují u více než 50 % maligních onemocnění (10). U nádorů močového měchýře je ztráta funkce tohoto genu spojována s agresivním chováním a špatnou prognózou (11). Mutace genu TP53 je obvykle doprovázena produkcí patologického proteinu p53, který má mnohonásobně prodloužený poločas a zvýšenou jadernou akumulaci oproti proteinu fyziologickému (12, 13). Zatímco normální p53 nelze zpravidla vzhledem k jeho krátkému poločasu detekovat, je možno patologický protein imunohistochemicky znázornit mnohem snáze. Nabízí se tedy poměrně jednoduchá metoda detekce patologie TP53 proveditelná ve většině patologických laboratořích, která je navíc relativně spolehlivá. Bylo totiž prokázáno, že výsledek imunohistochemického vyšetření odráží s 90,3 % přesností změny na úrovni genetické (14).

První velmi pozitivní závěry naznačily prognostické využití u povrchových nádorů močového měchýře (15 - 18). Následovaly však výsledky ne zcela jednoznačné (19, 20), což zabránilo zařazení metody mezi klinicky rutinně využívané prognostické faktory.

Jednou z příčin rozporuplných výsledků i nejasností je nejednotná metodika zpracování a hodnocení imunohistochemického nálezu. Je produkováno velké množství protilátek proti p53, které se liší výrobcem i vlastnostmi. Příčinou horších výsledků některých studií může být polyklonální charakter použitých protilátek (19, 20). V naší studii jsme pracovali s monoklonální protilátkou využívanou i dalšími autory (21, 22). Zaznamenali jsme 59,2 % nemocných s více než 20 % pozitivních jader, což je poměrně vysoký počet, který se však přibližuje řadě citovaných údajů (15, 23).

Další příčinou rozdílných výsledků může být samozřejmě i kvalita vstupního vzorku (zhmoždění tkáně, délka fixace).

Interpretace nálezu není jednotně prezentována. Patolog obvykle uvádí procentuální četnost pozitivně zbarvených nádorových jader. Definuje sice celkový počet hodnocených buněk a určité podmínky hodnocení, výsledek je však nepochybně do značné míry subjektivní. Tento způsob navíc nebere v úvahu intenzitu pozitivity jednotlivých jader. Námi v této indikaci poprvé

použitá metoda výpočtu HSCORE dle Bacusové (9) je semikvantitativní, protože rozlišuje 4 stupně intenzity zbarvení jednotlivých jader. Objektivita metody je navíc zvýšena využitím počítačové techniky. Z těchto důvodů se jedná o perspektivní postup, což podporují i prezentované výsledky. Dopracováním může vzniknout zcela objektivní a standardně proveditelná metoda přinášející srovnatelné výsledky. Mají-li totiž být sledovány přesnější klinicko-morfologické vztahy, musí být cílem nikoliv semikvantitativní stanovení p53, nýbrž stanovení kvantitativní, provedené densitometricky reprodukovatelným standardizovaným postupem. To bude vyžadovat překlenutí laboratorních problémů, konkrétně vytvoření preparátu bez nežádoucí nespecifické reakce pozadí, a přesné vymezení denzitních intervalů pro slabé, střední a silné pozitivitu.

Zásadním a dosud neuzavřeným problémem je vymezení hranice, od které již vzorek tkáně považujeme za pozitivní. Jinými slovy, jak výrazná p53 pozitivita má význam pro předpověď dalšího chování malignity. V literatuře jsou používány různé hranice, obvykle 5 %, 10 % nebo 20 % zbarvených jader při procentuálním vyjádření, u HSCORE tato hranice zatím nebyla definována vůbec. Dle našich výsledků je optimální hranicí nález 20 % zbarvených jader při procentuálním vyjádření a HS 200 při vyjádření pomocí HSCORE.

Negativním rysem naší studie je nepochybně retrospektivní způsob zařazení nemocných a tato skutečnost může samozřejmě částečně ovlivnit dosažené výsledky. Přesto lze konstatovat, že imunohistochemický nález p53 pozitivitu je v našem souboru spojen s méně příznivým průběhem povrchového nádoru močového měchýře, tedy se statisticky vyšší pravděpodobností recidivy i progresu onemocnění.

Absence prognostického významu dalších hodnocených faktorů, s výjimkou stupně histologické diferenciace, jen zdůrazňuje význam nalezení jiného spolehlivého faktoru i možný přínos a perspektivu imunohistochemického vyšetření p53.

Rutinní využití p53 jako prognostického faktoru u povrchových nádorů močového měchýře si nepochybně vyžádá další úsilí. Jeho cílem musí být na jedné straně standardizace imunohistochemického průkazu a objektivizace vyhodnocení výsledku, na druhé straně další výzkum na úrovni molekulární biologie, který upřesní naše znalosti o konkrétní úloze p53 v regulaci buněčného cyklu a jeho vztahu k funkci dalších genů a jejich proteinových produktů.

ZÁVĚR:

1. Pozitivita imunohistochemického vyšetření p53 je spojena s vyšší pravděpodobností recidiv i progresu povrchového nádoru močového měchýře.

2. HSCORE považujeme za vhodný způsob kvantifikace výsledků. Tento postup znamená při současně dostupné kvalitě preparátů vyšší stupeň objektivizace vyhodnocení. Optimální hraniční hodnotou pro označení p53 pozitivitu je HS 200.

LITERATURA

1. Lutzeyer, W., Rübber, H., Dahm, H.: Prognostic parameters in superficial bladder cancer: An analysis of 315 cases. *J Urol*, 127, 1982, 2, 250-252.
2. Lamm, D.L.: Long-term results of intravesical therapy for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*, 19, 1992, 3, 573-580.
3. Kurth, K.H., Denis, L., Bouffieux, C., Sylvester, R., Debruyne, F.M.J. et al.: Factors affecting recurrence and progression in superficial bladder tumours. *Eur J Cancer* 31A, 1995, 11, 1840-1846.
4. Zlotta, A.R., Noel, J.-Ch., Fayt, I., Drowart, A., Van Vooren, J.-P. et al.: Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol*, 161, 1999, 3, 792-798.
5. Keegan, P.E., Lunec, J., Neal, D.E.: p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *Brit J Urol*, 82, 1998, 710-720.
6. Pacík, D., Vít, V., Turjanica, M.: Intravezikální imunoterapie povrchového karcinomu močového měchýře BCG vakcínou. *Rozhl Chir*, 76, 1997, 10, 482-485.
7. Babjuk, M.: Intravezikální instilace BCG vakcíny v léčbě povrchových nádorů močového měchýře. *Prakt Lék*, 77, 1997, 5, 238-240.
8. Bártek, J., Iggo, R., Gannon, J., Lane, D.P.: Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 5, 1990, 893-899.
9. Bacus, S., Flowers, J.L., Press, M.F., Bacus, J.W., McCarty, K.S., Jr.: The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol*, 90, 1988, 233-239.
10. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C.: p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 1991, 49-53.
11. Spruck III, C.H., Ohneseit, P., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N. et al.: Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, 54, 1994, 784-788.
12. Reich, N.C., Oren, M., Levine, A.J.: Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol*, 3, 1983, 12, 2143-2150.
13. Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.-H., Eliyahu, D., Oren, M., Levine, A.J.: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*, 8, 1988, 2, 531-539.
14. Cordon-Cardo, C., Dalbagni, G., Saez, G.T., Oliva, M.R., Zhang, Z.-F. et al.: p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer*, 56, 1994, 3, 347-353.
15. Sarkis, A.S., Dalbagni, G., Cordon-Cardo, C., Zhang, Z.-F., Sheinfeld, J. et al.: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1993, 1, 53-59.
16. Sarkis, A.S., Zhang, Z.-F., Cordon-Cardo, C., Melamed, J., Dalbagni, G. et al.: p53 nuclear overexpression and disease progression in Ta bladder carcinoma. *Int J Oncol*, 3, 1993, 2, 355-360.
17. Sarkis, A.S., Dalbagni, G., Cordon-Cardo, C., Melamed, J., Zhang, Z.-F. et al.: Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol*, 152, 1994, 2, 388-392.
18. Serth, J., Kuczyk, M.A., Bokmeyer, C., Hervatin, C., Nafe, R. et al.: p53 immunohistochemistry as an independent prognostic factor for superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer*, 71, 1995, 1, 201-205.
19. Lipponen, P.K.: Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer*, 53, 1993, 365-370.
20. Underwood, M.A., Reeves, J., Smith, G., Gardiner, D.S., Scott, R. et al.: Overexpression of p53 protein and its significance for recurrent progressive bladder tumors. *Br J Urol*, 77, 1996, 5, 659-666.
21. Vorreuther, R., Hake, R., Heidenreich, A., Thiele, J., Engelmann, U.: Der Wert immunohistochemischer Marker (PCNA, K-67, 486p und p53) in der Abschaetzung des Rezidivrisikos oberflächlicher Blasenkarzinome. *Akt Urol*, 28, 1997, 2, 109-114.
22. Esrig, D., Spruck, Ch.H. III, Nichols, P.W., Chaiwun, B., Steven, K. et al.: p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol*, 143, 1993, 5, 1389-1397.
23. Raitanen, M.P., Tammela, T.L.J., Kallioinen, M., Isola, J.: P53 accumulation, deoxyribonucleic acid ploidy, and progression of bladder cancer. *J Urol*, 157, 1997, 4, 1250-1253.

as. MUDr. Marko BABJUK
Urologická klinika 1. LF UK a VFN
Ke Karlovu 6
128 08 Praha 2

Poděkování:

Autoři děkují paní Mgr. Věře Kubánkové za statistické zhodnocení získaných dat.