

Mesane ürotelyal karsinomlarında Siklin D1/p16/Ki-67 belirteçlerinin prognostik önemi

The Prognostic significance of the Cyclin D1/p16/Ki-67 markers in bladder urothelial carcinomas

İlyas Sayar

Department of Pathology, Erzincan University, Faculty of Medicine, Erzincan-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 11.11.2016

Kabul Tarihi:12.12.2016

Doi: 10.21601/ortadogutipdergisi.265416

Öz

Amaç: Ürotelyal karsinomların Siklin D1/p16/Ki-67 ekspresyonunu araştıran gerek ayrı ayrı ve gerekse ikili kombinasyonu ile yapılan az sayıda çalışmada sonuçlar farklılık göstermektedir. Bu çalışmada, mesane ürotelyal karsinomlarında Siklin D1/p16/Ki-67 belirteçlerinin patolojik prognostik faktörler ile ilişkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Toplam 149 mesane ürotelyal karsinomu patoloji arşivinden seçildi. Tüm olgularda histopatolojik bulgular tekrar gözden geçirildi ve WHO/ISUP sistemine göre derecelendirme uygulandı. Her olgu için seçilen bir doku bloğuna Siklin D1/p16/Ki-67 için immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirildi.

Bulgular: Siklin D1 boyanma oranı ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda daha yüksek bulunmuştur. p16 boyanma oranı; yüksek grade, rekürrens görülen ve mortalite yüksek görülen olgularda anlamlı düzeyde yüksektir. Ki-67 boyanma oranı ise ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda high (skor 3) görülme oranı, ilk pT evresi T2-T4, yüksek grade, rekürrens ve progresyon görülen olgulara göre anlamlı düzeyde düşüktür.

Sonuç: Mesane ürotelyal karsinomlu hastalarda Siklin D1/p16/Ki-67 belirteçlerinin tümörün yüksek gradeliği ve rekürrensiyle istatistiksel olarak anlamlı bir birliktelik vardır. Siklin D1/p16/Ki-67 birlikteliği ürotelyal karsinomların progresyonunda ve diferansiyasy

Anahtar Kelimeler: Ürotelyal karsinom, Siklin D1, p16, Ki-67

Abstract

Aim: The results of a small number of studies on the expression of cyclin D1 / p16 / Ki-67 in urothelial carcinomas, either individually or in combination with each other, differ. In this study, the relationship between Cyclin d1 / p16 / Ki-67 markers in pathologic prognostic factors of bladder urothelial carcinoma was investigated.

Material and Method: A total of 149 bladder urothelial carcinomas were selected from the pathology archive. In all cases, histopathological findings were reviewed and graded according to the WHO / ISUP system. Immunohistochemical staining for Cyclin d1 / p16 / Ki-67 was performed on a selected tissue block for each case.

Results: The rate of cyclin d1 staining was found to be higher in the first pT stage Ta-T1, low grade, recurrence and non-progressive cases. The rate of positivity is significantly higher in cases with high grade p16 staining, recurrence and high mortality. The Ki-67 staining rate is significantly lower than the first pT stage Ta-T1, low grade, high (score 3) incidence in cases without recurrence and progression, first pT stage T2-T4, high grade, recurrence and progression.

Conclusion: Cyclin d1 / p16 / Ki-67 markers in patients with bladder urothelial carcinoma have a statistically significant association with tumor grade and recurrence. Cyclin d1 / p16 / Ki-67 association may play a role in the progression and differentiation of urothelial carcinomas.

Keywords: Urothelial carcinoma, Cyclin D1, Ki- 67, p16

Giriş

Mesane karsinomları dünya çapında erkeklerde en sık görülen dördüncü, kadınlarda yedinci kanserdir ve tedavilerdeki gelişmelere rağmen prognozu halen kötü seyretmektedir(1, 2). Mesane karsinomlarından ürotelyal karsinomlarda yüzeysel formdan invaziv forma ilerledikçe mortalite ve rekürrens oranları artmaktadır(3). Hastaların %70 inde tümör lamina propriaya sınırlıdır. Bu hastaların %50 sinde en az bir kez rekürrens görülebilmekte ve %15 ile %20 kadarında histolojik grade ve invazyon derinliği artmaktadır. Rekürrens ve prognoz belirlenmesinde rutin olarak tümör çapı, grade, stage gibi faktörler kullanılmakta ise de çoğu zaman bu faktörler tümör gidişatının belirlenmesinde yeterli olmamaktadır(4).

Tüm tümör olgularında olduğu gibi mesane karsinomlarında da rekürrens ve prognoz belirlenmesi yolu ile tedavi metodlarının etkinliğinin anlaşılmasına dönük çalışmalar devam etmektedir. Bunun yolu da rekürrens ve prognozu gösteren etkin belirteçlerin kullanılmasından geçmektedir. Bu belirteçlerden olan Siklin D1'in mesane kanserinin ortaya çıkmasında, gelişmesinde ve yaygınlaşmasında çok önemli rol üstlendiği bildirilmiştir(5). Siklin D1 11q13 kromozomunda yer almaktadır. Hücre döngüsünde d1 kısıtlama noktasında bir major düzenleyici olarak anahtar rol oynamaktadır(5,6). Çeşitli kanserlerde Siklin D1 gen ekspresyonu değişmektedir. Bu da Siklin D1 düzensizliğinin tümör oluşumunda katkısı olduğunu düşündürmektedir. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16 tümör, supressör gen olarak tanımlanmaktadır. Birçok kanser türünde p16 geni metilasyon, delesyon, mutasyon gibi yollarla inaktivasyona uğramaktadır(7-11). Ki-67 ise hücre döngüsünün G1, S, G2 fazlarında rol alan nükleer bir antijendir. Ki-67 ekspresyonunun tümöral hücre çoğalması ve tümöral büyüme ile yakın ilişkisi olup patolojik tanısallıkta rutin olarak yaygın olarak proliferasyon belirteci olarak kullanılmaktadır(12-14).

Bu çalışmada mesane ürotelyal karsinom nedeniyle transüretal rezeksiyon(TUR) yapılan hastalarda Siklin D1, p16, Ki-67 belirteçlerinin; tümörün ilk evresi, grade, rekürrens, progresyon ve mortalite ile ilişkilerini değerlendirmeyi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya 2007- 2015 tarihleri arasında TUR yapılan ve mesane ürotelyal karsinom tanısı konan 149 hasta dahil edildi. Tüm patolojik kesitlerin orijinal tanıları doğrulandı. Hastalar operasyon öncesi kemoterapi ve/veya radyoterapi almayanlar arasından seçildi. Hasta kayıtlarından cinsiyet, yaş, ilk gradeleri, CIS varlığı ve/veya yokluğu, rekürrens, progresyon, hastanın statüsü not edildi. Hematoksilin eozin kesitleriyle karşılaştırıldıktan sonra parafin blokların uygun yerlerinden 4 mm çapında silindirik örnekler alındı. Bu işlem doku mikro dizin cihazı (Manual Tissue Microarray, Quick Ray, Unitima, Co. Ltd., Seoul, Korea) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu doku örnekleri immunhistokimyasal boyama için tekrar parafinli bloklara gömülerek lizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Daha sonra bu lamlar tam otomatik immunhistokimyasal boyama cihazında (Leica Bond-Max, Melbourne, Australia) Şiklin D1 (Thermo Scientific, ER 2, 1/25), p16 (Novocastra, ER 2, 1/100) ve Ki- 67 (Biogenex, ER 2, 1/20) belirteçleri ile işleme tabi tutuldu.

Siklin D1 için tümör hücrelerinin %25 inden fazlasında koyu nükleer immunoaktivite gözlemlenenler pozitif kabul edildi(14). P16 için hem nükleer hem de sitoplazmik boyanma miktarına göre; hiç p16 tutmayanlar 0,0-30% oranında tutulum gösterenler 1, 31-60% oranında tutulum gösterenler 2, 61-90 oranında tutulum gösterenler 3, 91-100% oranında tutulum gösterenler 4 puan olarak değerlendirildi. Ayrıca p16 tutulum yoğunluğuna göre zayıf, orta ve güçlü olmak üzere ikinci bir değerlendirme yapıldı. İstatiksel analiz için bu iki değerlendirme final skorlamasına tabi tutuldu. Final skorlaması neticesinde p16 skoru 0 çıkanlar negatif, 5% den daha yüksek çıkanlar pozitif olarak kabul edildi(15). Ki -67 için nükleer boyanan hücre yüzdelere göre hesaplandı. 400 lük büyütmede her kesit için, 500 ile 1000 arası hücre 5-6 alanlarda sayıldı. Ki 67 boyanma oranı 0-10% arasında ise skor 0, 11-25% arasında ise skor 1, 26-50% arasında ise skor 2, 50% den fazla boyanmış ise skor 3 olarak kabul edildi (16). Mikroskopik değerlendirme için Olympus BX53 mikroskobu (Tokyo, Japonya) kullanıldı. Bu değerlendirmeler semikantitatif olarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen üç ve üzeri grupların karşılaştırmalarında ise Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U Test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-Kare testi, Fisher's Exact test, Fisher-Freeman-Halton test ve Yates' Continuity Correction test (Yates düzeltilmeli Ki-kare) kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,01$ ve $p < 0,05$ düzeylerinde değerlendirildi

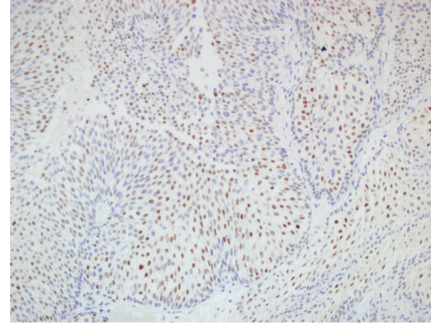
Sonuçlar

Çalışmaya katılan olguların yaşları 37 ile 98 yıl arasında değişmekte olup, ortalama $67,58 \pm 10,89$ yıldır. Çalışmaya katılan olguların %74,5'i erkek, %25,5'i kadındır. Olguların 17 sinde CIS mevcut iken, 132 sinde mevcut değildir. İlk PT evresine göre olguların 107 si Ta-T1 evresinde iken, 42 si T2-T4 evresindedir. 66 olgu düşük grade sahip iken 83 olgu yüksek grade sahiptir. 73 olguda rekürrens, 46 olguda progresyon gözlemlenmiştir. 111 olgu hayatta, 38 olgu ise yaşamlarını kaybetmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı

Yaş (yıl)		Min-Mak	Ort±SS
		37-98	67,58±10,89
		n	%
Cinsiyet	Erkek	111	74,5
	Kadın	38	25,5
Yaş Grupları	< 65 yaş	61	40,9
	≥ 65 yaş	88	59,1
CIS	Yok	132	88,6
	Var	17	11,4
İlk PT	Ta-T1	107	71,8
	T2-T4	42	28,2
Grade	Düşük	66	44,3
	Yüksek	83	55,7
Rekürrens	Rekürrens (-)	76	51,0
	Rekürrens (+)	73	49,0
Progresyon	Progresyon (-)	103	69,1
	Progresyon (+)	46	30,9
Statü	Yaşıyor	111	74,5
	Ex	38	28,5
Gruplar	Rekürrens (+) Progresyon (+)	47	31,5
	Rekürrens (+) Progresyon (-)	33	22,1
	Rekürrens (-) Progresyon (-)	69	46,3

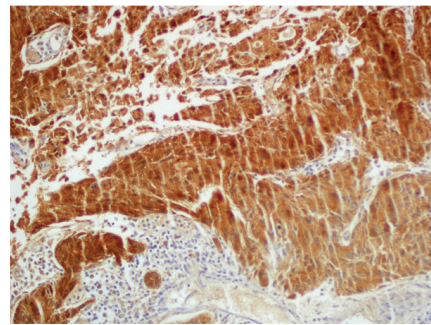
Siklin D1 skorları ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda, ilk pT evresi T2-T4 olan, yüksek grade, rekürrens ve progresyon görülen olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede pozitif bulunmuştur ($p < 0,01$) (Resim 1).



Resim 1: Düşük gradeli mesane ürotelyal karsinomunda artmış Siklin D1 ekspresyonu (x200)

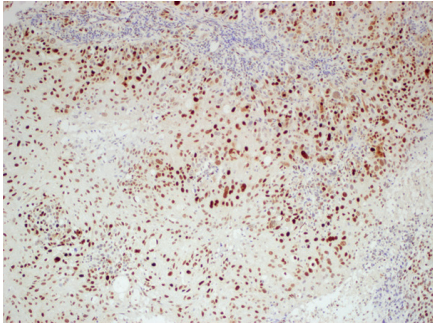
CIS varlığı ve statüye göre ise Siklin D1 skorları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$). Hem rekürrens hem progresyon olan, rekürrens olan progresyon olmayan, ne rekürrens ne de progresyon olmayan olguların Siklin D1 pozitifliğinin karşılaştırıldığı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,01$). Rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda pozitiflik oranı, diğer olgulara göre anlamlı düzeyde yüksektir (Tablo 2).

P16 skorları yüksek grade (Resim 2), rekürrens görülen ve mortalite yüksek görülen olgularda pozitiflik oranı anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0,01$). İlk pT evresine, CIS varlığına ve progresyon varlığına göre p16 skorları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$). Hem rekürrens hem progresyon olan, rekürrens olan progresyon olmayan, ne rekürrens ne de progresyon olmayan olguların karşılaştırıldığı gruplarda da p16 skorları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$) (Tablo 2).



Resim 2: Yüksek gradeli mesane ürotelyal karsinomunda artmış p16 ekspresyonu (x200)

Ki-67 skorları ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda high (skor 3) görülme oranı, ilk pT evresi T2-T4 olan, yüksek grade (Resim 3), rekürrens ve progresyon görülen olgulara göre anlamlı düzeyde düşüktür ($p < 0,01$). Ex olan olgularda high (skor 3) Ki-67 görülme oranı, yaşayan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0,01$). Gruplara göre olguların Ki-67 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 2).



Resim 3: Yüksek gradeli mesane ürotelyal karsinomunda artmış Ki-67 ekspresyonu(x200)

Tablo 2. Tanımlayıcı özelliklerin p16/Ki-67/ Siklin D1 ölçüm değerleri ile ilişkisi

		P16		Ki-67S		iklin D1			
		0	1	0	12	30		1	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
İlk PT Evresi	Ta-T1	36 (33,6)	71 (66,4)	9 (8,4)	48 (44,9)	37 (34,6)	13 (12,1)	37 (34,6)	70 (65,4)
	T2-T4	11 (26,2)	31 (73,8)	0 (0,0)	7 (16,7)	18 (42,9)	17 (40,5)	29 (69,0)	13 (31,0)
	p	*0,493				*0,001**			*0,001**
Grade	Düşük	35 (53,0)	31 (47,0)	7 (10,6)	36 (54,5)	18 (27,3)	5 (7,6)	15 (22,7)	51 (77,3)
	Yüksek	12 (14,5)	71 (85,5)	2 (2,4)	19 (22,9)	37 (44,6)	25 (30,1)	51 (61,4)	32 (38,6)
	p	*0,001**				*0,001**			*0,001**
CIS	Negatif	43 (32,6)	89 (67,4)	9 (6,8)	48 (36,4)	46 (34,8)	29 (22,0)	57 (43,2)	75 (56,8)
	Pozitif	4 (23,5)	13 (76,5)	0 (0,0)	7 (41,2)	9 (52,9)	1 (5,9)	9 (52,9)	8 (47,1)
	p	*0,632				*0,248			*0,615
Rekürrens	Yok	30 (39,5)	46 (60,5)	5 (6,6)	31 (40,8)	32 (42,1)	8 (10,5)	25 (32,9)	51 (67,1)
	Var	17 (23,3)	56 (76,7)	4 (5,5)	24 (32,9)	23 (31,5)	22 (30,1)	41 (56,2)	32 (43,8)
	p	*0,051				*0,026*			*0,004**
Progresyon	Yok	36 (35,0)	67 (65,0)	5 (4,9)	41 (39,8)	46 (44,7)	11 (10,7)	39 (37,9)	64 (62,1)
	Var	1 (23,9)	35 (76,1)	4 (8,7)	14 (30,4)	9 (19,6)	19 (41,3)	27 (58,7)	19 (41,3)
	p	*0,251				*0,001**			*0,029*
Statü (Mortalite)	Yaşıyor	41 (36,9)	70 (63,1)	9 (8,1)	43 (38,7)	46 (41,4)	13 (11,7)	45 (40,5)	66 (59,5)
	Exitus	6 (15,8)	32 (84,2)	0 (0,0)	12 (31,6)	9 (23,7)	17 (44,7)	21 (55,3)	17 (44,7)
	p	*0,026*				*0,001**			*0,165
Gruplar	Rekürrens (+) Progresyon (+)	14 (29,8)	33 (70,2)	4 (8,5)	14 (29,8)	16 (34,0)	13 (27,7)	26 (55,3)	21 (44,7)
	Rekürrens(+) Progresyon (-)	6 (18,2)	27 (81,8)	0 (0,0)	10 (30,3)	14 (42,4)	9 (27,3)	19 (57,6)	14 (42,4)
	Rekürrens(-) Progresyon (-)	27 (39,1)	42 (60,9)	5 (7,2)	31 (44,9)	25 (36,2)	8 (11,6)	21 (30,4)	48 (69,6)
	p	*0,099				*0,109			*0,007**

Tartışma

Son yıllarda düzenleyici moleküllerin sinyal iletim yollarında üstlendikleri yolun tanımlanması hücrel yaşama, apoptoz, çoğalma, metastaz ve invazyon gibi tümöre bağlı süreçleri anlamadaki ufukumuzu genişletmiştir(17). Ana nedeni mutasyonlar olan apoptoz değişiklikleri karsinogenezde, kanser hücrelerinin hayatlarını devam ettirmede, hastalığın metastaz ve invazyon yapma kapasitelerini belirlemede önemli rol oynarlar(18). Genlerin epitelyal mesenşimal geçiş, apoptozis ve anjiogenesis ile ilişkisi birçok çalışmada incelenmiş olsa da, mesane kanser olgularının gidişatının belirlenmesinde daha köklü, tanısal değeri daha yüksek tanımlamalara ihtiyaç vardır(19-22).

Son yıllarda artan oranlarda mesane kanser olgularında prognostik belirteçler için ciddi harcamalar yapılmaktadır. Bu belirteçlerden biri olan Siklin D1'in mesane kanserinin prognozunu belirlemedeki yerini değerlendirmek için yapılan bir meta-analizde; artmış Siklin D1 boyanmanın iyi prognozla birlikte olduğu ancak bu konuda sınırlı çalışmalar bulunduğu, yeni ve geniş serili çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır(22). Bizim 149 vakalık çalışmamızda; Siklin D1 boyanma oranı ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda, ilk pT evresi T2-T4, yüksek grade, rekürrens ve progresyon görülen olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunması(p<0,01) boyanma oranı ile bu prognostik faktörler arasında ki ters ilişkiye dikkat çekmektedir. Diğer bir yandan Siklin D1 negatifliği yüksek rekürrens ve progresyon görülme riski ile birliktelik içermektedir.

P16 hücre siklusunun G1-S kontrol evresinde Rb proteinlerini artırmak suretiyle rol almaktadır. Bu nedenle p16 eksikliği Rb protein eksikliğine yol açar ki buda uygunsuz hücre proliferasyonuna neden olur(6-11). P16/ Siklin D1 /Rb yolunu inaktive olmasının mesanede ürotelyal karsinoma yol açtığı bilinmektedir(5,11). Bizim çalışmamızda; artmış p16 skorları ile yüksek grade, rekürrens görülen ve artmış mortalite olgularda daha anlamlı düzeyde yüksek bulunması daha önce yapılan nadir çalışmaları desteklemektedir ve önemlidir(p<0,01).

Kas invazyonu olmayan mesane tümörlerinde yapılan çalışmalarda tümör rekürrens ve progresyonunun Ki-67 indexine bağlı olduğu başarıyla gösterilmiştir(12-14). Bizim çalışmamızda; Ki-67 skorları ilk pT evresi Ta-T1, düşük grade, rekürrens ve progresyon görülmeyen olgularda yüksek (skor 3) görülme oranı, ilk pT evresi T2-T4, yüksek grade, rekürrens ve progresyon görülen olgulara göre anlamlı düzeyde düşüktür(p<0,01). Ayrıca Ex olan olgularda yüksek (skor 3) Ki-67 boyanma oranı, yaşayan olgulara göre anlamlı düzeyde yüksektir(p<0,01). Bu sonuçlar Ki-67 nin mesane karsinomunda prognostik belirteç olarak faydalı olduğunun bir göstergesidir.

Diğer yandan Ki-67 ve p16 boyanmanın mesane kanseri

rekürrens ve progresyonunu gösteren bağımsız belirteçler olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (23-26). Bizim çalışmamızda ise Ki-67/p16 ise birlikte yüksek grade, rekürrens ve artmış mortalitesi ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Buna ilaveten Siklin D1/Ki-67 birlikte, tümörün ilk pT evresi yüksek olanlarda, yüksek grade olanlarda, rekürrens ve progresyon görülen tümörlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Siklin D1/p16 birlikte yüksek grade ve rekürrens görülen hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Siklin D1/p16/Ki-67 belirteçlerinin mesane kanserlerinde prognozla ilişkisi tek tek veya ikili kombine olarak az sayıda da olsa çalışılmakla beraber üçünün birarada değerlendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Siklin D1/p16/Ki-67 belirteçlerinin üçünü birden karşılaştırdığımız çalışmamızda yüksek grade ve rekürrens ile istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Sonuç olarak; mesane tümörlü hastalarda rekürrens ve prognoz belirlenmesinde rutin olarak tümör çapı, grade, stage gibi parametreler kullanılmakta ise de çoğu zaman bu parametreler tümör gidişatının belirlenmesinde yeterli olmamaktadır. Mesane ürotelyal karsinomlu hastalarda Siklin D1/p16/Ki-67 ekspresyonunun tümörün yüksek gradeliği ve rekürrensiyle istatistiksel olarak anlamlı bir birlikteliği olması bu belirteçlerin mesane ürotelyal karsinom için prognostik bir belirteç olarak kabul edilebileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların çıkara dayalı bir ilişkisi yoktur.

Teşekkür: Prof. Dr. Abdullah Aydın hocamıza katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2012;62:10-29.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.
3. Tadin T, Krpina K, Stifter S, Babarovic E, Fuckar Z, Jonjic N. Lower cyclooxygenase-2 expression is associated with recurrence of solitary non-muscle invasive bladder carcinoma. Diagn Pathol 2012;7:152.
4. Goyal S, Singh UR, Sharma S, Kaur N. Correlation of mitotic indices, AgNor count, Ki-67 and Bcl-2 with grade and stage in papillary urothelial bladder cancer. Urol J 2014;11:1238-47.
5. Niehans GA, Kratzke RA, Froberg MK, Aeppli DM, Nguyen PL, Geradts J: G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Br J Cancer 1999;80:1175-84.
6. Strauss M, Lukas J, Bartek J: Unrestricted cell cycling and cancer. Nat Med 1995;1:1245-6.
7. Raspollini MR, Minervini A, Lapini A, Lanzi F, Rotellini M, Baroni G, et al. A proposed score for assessing progression in pT1 high-grade urothelial carcinoma of the bladder. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2013;21:218-27.

8. Salehinejad J, Sharifi N, Amirchaghmaghi M, Ghazi N, Shakeri MT, Ghazi A. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. *Ann Diagn Pathol* 2014;18:210-3.
9. Rawish KR, Desouki MM, Crispens MA, Fadare O. Conventional endometrioid adenocarcinomas of the endometrium recurring as clear cell tumors: comparative immunohistochemical analyses. *Ann Diagn Pathol* 2013;17:270-5.
10. van Bogaert LJ. P16INK4a immunocytochemistry/immunohistochemistry: need for scoring uniformization to be clinically useful in gynecological pathology. *Ann Diagn Pathol* 2012;16:422-6.
11. Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, Alavi Tafreshi M, Shi SR, Fung YK, et al. Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *J Pathol* 2004;203:762-70.
12. Ding W, Gou Y, Sun C, Xia G, Wang H, Chen Z, et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol* 2014;32:13-9.
13. Pich A, Chiusa L, Formiconi A, Galliano D, Bortolin, P, Comino A et al. Proliferative activity is the most significant predictor of recurrence in noninvasive papillary urothelial neoplasms of low malignant potential and grade 1 papillary carcinomas of the bladder. *Cancer* 2002;95:784-90.
14. Sgambato A, Migaldi M, Faraglia B, De Aloysio G, Ferrari, P, Ardito R, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002;97:671-8.
15. Sugianto J, Sarode V, Peng Y. Ki-67 expression is increased in p16-expressing triple-negative breast carcinoma and correlates with p16 only in p53-negative tumors. *Hum Pathol* 2014; 45: 802-9.
16. Wang L, Feng C, Ding G, Zhou Z, Jiang H, Wu Z. Relationship of TP53 and Ki67 expression in bladder cancer under WHO 2004 classification *J BUON* 2013;18: 420-4.
17. Fahmy M, Mansure JJ, Brimo F, Yafi FA, Segal R, Althunayan A, et al. Relevance of the mammalian target of rapamycin pathway in the prognosis of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Hum Pathol* 2013;44:1766-72.
18. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2941-53.
19. Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, Jacobs MA, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2007; 13:1685-94.
20. Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, Fradet Y, Ashfaq R, Bastian PJ, et al. p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder. *BJU Int* 2010;105:489-95.
21. Fauconnet S, Bernardini S, Lascombe I, Boiteux G, Clairotte A, Monnien F, et al. Expression analysis of VEGF-A and VEGF-B: relationship with clinicopathological parameters in bladder cancer. *Oncol Rep* 2009;21:1495-504.
22. Ren B, Li W, Yang Y, Wu, S. The impact of cyclin D1 overexpression on the prognosis of bladder cancer: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology* 2014;1:1.
23. Krüger S, Mahnken A, Kausch I, Feller AC. P16 immunoreactivity is an independent predictor of tumor progression in minimally invasive urothelial bladder carcinoma. *Eur Urol* 2005;47:463-7.
24. Bartoletti R, Cai T, Nesi G, Girardi LR, Baroni G, Dal Canto M. Loss of P16 expression and chromosome 9p21 LOH in predicting outcome of patients affected by superficial bladder cancer. *J Surg Res* 2007;143: 422-7.
25. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, Lameiras CR, Lopes P, Bento MJ, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:74-80.
26. Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol* 2006;50:506-15.

Sorumlu Yazar: İlyas Sayar

Erzincan Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Erzincan Türkiye

Email: drilyassayar@hotmail.com