

Yüzeyel mesane kanserli hastalarda hyaluronidaz-1 ekspresyonunun rekürrens ve progresyon üzerine etkisi

Eren İLHAN (*), Gökhan ATIŞ (**), Eyyüp Sabri PELİT (**), Cenk GÜRBÜZ (**), Serkan ŞENOL (***), Asif YILDIRIM (**), Mert KILIÇ (**), Turhan ÇAŞKURLU (**)

ÖZET

Amaç: Hyaluronik asit, bağ dokunun yapısını oluşturan temel yapılardandır. Hyaluronoglucosaminidase-1 (HYAL-1), hyaluronik asiti yıkan bir endoglikozidazdır. Çalışmanın amacı, HYAL-1 ekspresyonunun yüzeyel mesane tümörü tanısı alan hastalarda progresyon ve rekürrens üzerine olan etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Kliniğimizde mesane tümörü tanısıyla TUR-BT yapılan ve düzenli takipleri olan 63 hastanın verileri retrospektif olarak incelendi. Hastaların ilk TUR-BT sonrası elde edilen patolojik spesimenleri HYAL-1 antikoru ile manuel yöntemle immunohistokimyasal olarak boyandı. Hastalar boya tutma skoruna göre negatif, düşük, orta ve yüksek olmak üzere dört gruba kategorize edildi. Tüm spesimenler aynı patolog tarafından değerlendirildi. HYAL-1 skorlarına göre rekürrens ve progresyon durumları değerlendirildi.

Bulgular: Nüks gelişen 20 hastanın patolojik incelemesinde, spesimenlerin orta ve yüksek derecede boyanma oranları nüks gelişmeyen hastalara daha yüksekti (% 55 vs % 14, p=0.005). Benzer şekilde progresyon gelişen 6 hastada, spesimenlerin orta ve yüksek derecede boyanma oranları progresyon gelişmeyen hastalara göre anlamlı derecede daha yüksekti (% 83.30 vb. % 21, p=0.004). Nüks ve progresyonu etkileyen grade, tümör boyutu, tümör evresi, tümör morfolojisi, EORTC skoru, re-TUR durumu ve HYAL-1 skoru gibi faktörlerin multivariate cox regresyon incelemesinde; HYAL-1 skoru nüksü ve progresyonu öngörmeye en önemli parametreler olarak bulundu.

Sonuç: HYAL-1 ekspresyonu, yüzeyel mesane kanserlerinde rekürrens ve progresyonu öngörmektedir. Son dönemlerdeki literatürle uyumlu olan bulgumuz yüzeyel mesane kanseri takibinde risk gruplarının belirlenmesinde kullanışlı bir parametre olabilir.

Anahtar kelimeler: HYAL-1, mesane kanseri, nüks, progresyon

SUMMARY

The effect of hyaluronidase-1 expression on recurrence and progression in patients with superficial bladder tumor

Objective: Hyaluronic acid is a one of major component of connective tissue. Hyaluronoglucosaminidase-1 (HYAL-1) is an endoglycosidase that dissolves hyaluronic acid. The main aim of the study is to evaluate the effect of HYAL-1 expression on progression and recurrence rates in patients with superficial bladder tumor.

Material and Methods: 63 patients, who underwent TUR-BT for bladder tumor and had available data, were analyzed retrospectively. Specimens of first TUR-BT were stained with HYAL-1 anticore immunohistochemically using manual method. Patients were divided to four groups according their staining scale as negative, low, intermediate and high. All specimens were analyzed by the same pathologist. Progression and recurrence rates in the groups were evaluated according the HYAL-1 scores.

Results: In evaluation of the pathological specimens of 20 patients who had recurrence, intermediate and high straining rates were higher than patients without recurrence (55 % VS 14 %, P=0.005). Similarly, in 6 patients who had progression, intermediate and high straining rates were higher than patients without progression (83.30 % vs 21 %, p=0.004). In multivariate cox analyses of factors that effects progression and recurrence rates such as grade, tumor size, stage, tumor morphology, EORTC score, re-TUR and HYAL-1 score; HYAL-1 score were observed the most significant factor for determining recurrence and progression.

Conclusions: HYAL-1 expression could predict recurrence and progression in patients with superficial bladder tumor and be used as a parameter to evaluate the risk groups on follow up of this patients.

Key words: Bladder tumor, HYAL-1, progression, recurrence

Geliş tarihi: 02.10.2012

Kabul tarihi: 10.12.2012

*Kırkkale Devlet Hastanesi, **İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, ***Patoloji Kliniği

Mesane kanserlerinin büyük çoğunluğu ilk tanı sırasında yüzeysel olmakla birlikte yüzeysel tümörlerde her zaman invaziv hale geçip yaşamı tehdit edebilecek duruma gelebilir ⁽¹⁾. Yüzeysel mesane tümörlerinde progresyon ve rekkürens öngörmek için kullanılan birçok prognostik faktör halen test edilmektedir ⁽²⁻⁴⁾.

Hyaluronik asit (HA) hücre duvarında ve bağ dokuda sık bulunan majör bir glikozaminoglikandır ve birçok tümörde HA seviyesi yükselmiş olarak tespit edilmiştir ⁽⁵⁻⁶⁾. HYAL-1 mesane kanserinde ifade edilen majör hyaluronidaz'dır ve yüksek grade mesane kanserlerinde güvenilir bir markerdir ⁽⁷⁻⁹⁾. Tümör hücreleri Hyaluronidaz (HYAL) ekspresyonu yaparak progresyon ve rekkürens gösterebilirler. ⁽¹⁰⁾.

Bu çalışmada tümör evresi, tümör boyutu, tümör sayısı, tümör grade'i, karsinoma in situ (CIS) varlığı gibi prognostik parametrelere ek olarak HYAL-1 ekspresyonunun rekkürens ve progresyonu öngörmedeki etkinliğini inceledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'nun 09.08.2011 tarihli ve 14/F sayılı oluru ile çalışmaya başlanmıştır. Çalışmaya Aralık 2005-Şubat-2011 arasında kliniğimize hematüri, alt üriner sistem semptomları veya başka bir nedenle başvuran, yapılan ultrasonografi (USG) de mesanede tümör şüpheli kitle görülen ve bu nedenle mesane tümörü ön tanısı ile TUR yapılarak histopatolojik inceleme sonucunda yüzeysel mesane tümörü tanısı alan 63 hasta retrospektif olarak dahil edildi. Daha önce bilinen mesane tümörü öyküsü olan hastalar, takipleri düzensiz veya 7 aydan kısa olan hastalar, T2 evre olan hastalar, patoloji spesmenleri hastanemiz patoloji kliniği dışındaki merkezlerce değerlendirilmiş hastalar, başka bir nedenle pelvik radyoterapi alan hastalar çalışma dışı tutuldu.

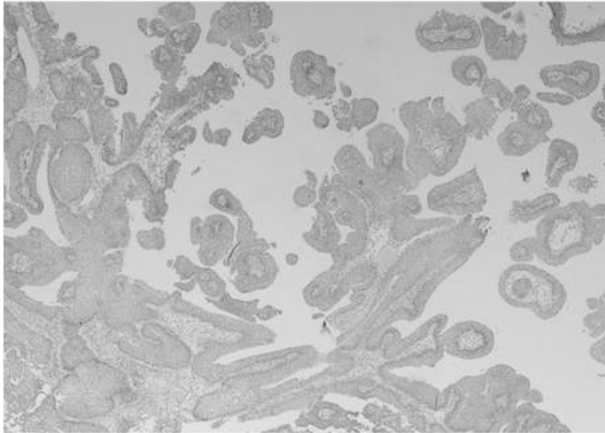
Tümör yükü 3 cm'den büyük olan, histopatolojik inceleme sırasında spesmende kas tabakası görülmeyen, yüksek grade ve multiple tümörü olan hastalara

Re-TUR yapıldı. EORTC nüks ve progresyon skorlamasına göre orta riskli görülen hastalara 6 haftalık intrakaviter Mitomycin-C tedavisi uygulandı. Yüksek riskli görülen hastalara Bacillus-Calmette Guerin (BCG) idame tedavisi verildi. Hastaların rutin takipleri; 1. yıl 3 aylık sistoskopilerle, 2. ve 3. yıllarda 6 aylık sistoskopiler ile, 3. yıldan sonra yıllık sistoskopilerle yapıldı. Ayrıca takiplerde gereken endikasyonlarda USG, intravenöz pyelografi (IVP) ve bilgisayarlı tomografi (BT) yapıldı. En az yedi aylık takip süresi bulunan hastaların patolojik piyesleri deparafinize edilerek tümürlü bloklar seçildi ve HYAL-1 antikoru ile manuel immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak boyandı. Spesmenler, üropatoloji konusunda deneyimli tek patolog tarafından değerlendirildi.

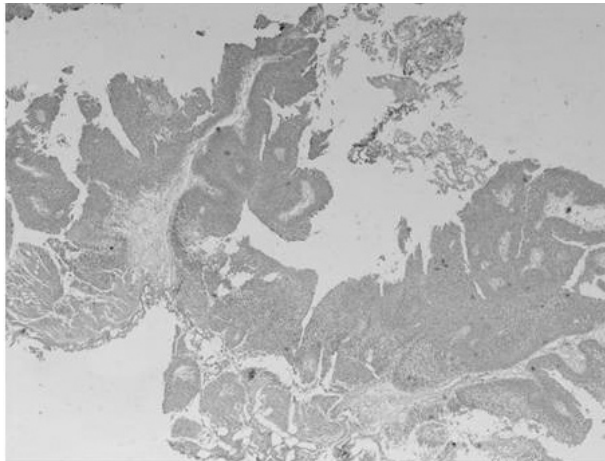
Boyama yöntemi: Seçilen parafin bloklardan elde edilen 3 mikrometre kalınlıktaki kesitler, önceden poly-L-Lysin ile kaplanmış lamlara alındı. Kesitler 60 C°'lik sıcaklıkta etüvde 1 saat bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için etüvden alınan kesitler 10 dk. süresince 2 ayrı şale ile ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi azalan alkollerden 90 dk.'da geçirilen kesitler distile su ile yıkandı. Antijeni ortaya çıkarmak için plastik taşıyıcıya alınan kesitler, kesit yüzeyini örtecek şekilde pH6 sitrat tamponu içine yerleştirildi. Dokuların etrafı hidrofobik kalem ile çizildi. Ardından hidrojen peroksit içinde 15 dk. bekletildi. 2'şer kez 10'ar dk.'lık sürelerle toplam 20 dk. mikrodalga fırında şoklandı. Oda sıcaklığında 20 dk. bekletildikten sonra kesitler distile su ile yıkandı. Kesitler phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. Nonspesifik bağlanmaları engellemek amacıyla kesitler üzerine Ultra V Block Nonspesifik Blocking Reagent (ScyTek Laboratories, USA) 10 dk. uygulandı. Ardından tavşan HYAL1 (Atlas antibodies, ürün kodu HPA002112) antikoru, 1: 150 oranında dilüe edilerek damlatıldıktan sonra 90 dk. bekletildi. Sonra 4 ayrı PBS banyosunda 10 dk. yıkandı. Sekonder antikor olarak Ultra Tek antipoli-valent biotinylated antibody (ScyTek Laboratories, USA) uygulandı ve 15 dk. bekletildi. Kesitler tekrar 4 ayrı PBS banyosunda yıkandı ve kesitlerin üzerine immün reaksiyonu gözlemlemek için işaretleyici

(label) olarak Ultra Tek HRP (ScyTek Laboratories, USA) damlatılarak 15 dk. beklendi. PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine immün reaksiyonu gözlemek için AEC kromojen sistemi (ScyTek Laboratories, AEC substrate kit, USA) uygulandı. 20 mikrolitre AEC kromojen 1 ml AEC substrat ile karıştırıldıktan sonra kesitlere 10 dk. süre ile uygulandı. Daha sonra kesitler distile su ile yıkayıp zıt boya olarak 1,5 dk. hematoksilin ile boyandı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak kesitler kapatıldı.

İmmün-reaktivitenin değerlendirilmesi: Tümör hücrelerindeki sitoplazmik ve perinükleer boyanma paternlerine göre; hiç boya tutmaması skor 0 (negatif) (Şekil 1), hafif derecede boya tutması skor 1 (düşük) (Şekil 2), orta derecede boya tutması skor 2 (orta) (Şekil 3) ve yüksek derecede boya tutma-

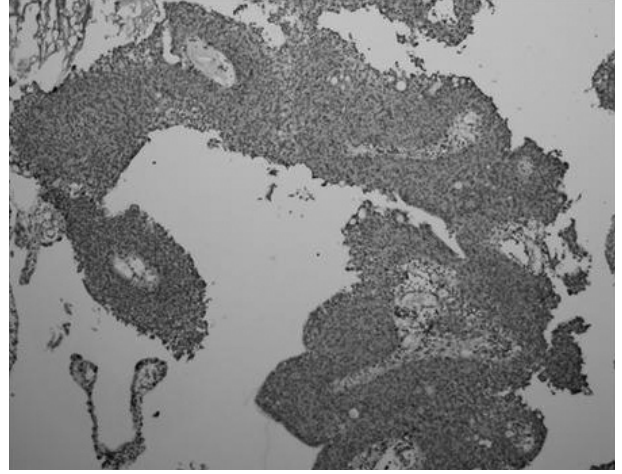


Şekil 1. HYAL-1 skor 0 (hiç boya tutmama, low grade TCC).

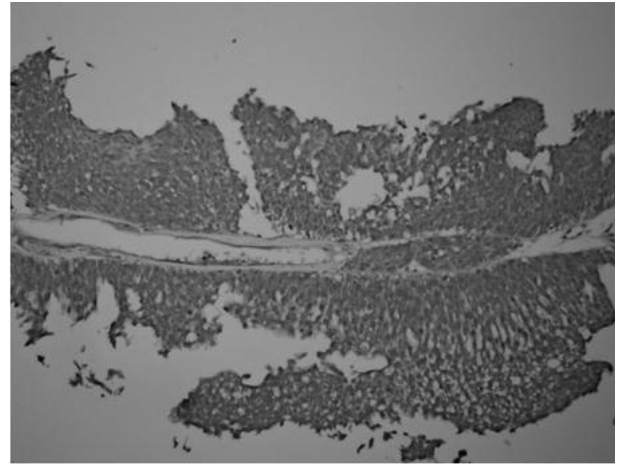


Şekil 2. HYAL-1 skor 1 (düşük boya tutması).

sı skor 3 (yüksek) (Şekil 4) olarak sınıflandırıldı. Farklı boyama paternleri olan spesmenlerde baskın olan skor kullanıldı.



Şekil 3. HYAL-1 skor 2 (orta derece boya tutması).



Şekil 4. HYAL-1 skor 3 (yüksek boya tutması).

Rekürrens ve progresyonun değerlendirilmesi:

Takip sistoskopilerinde tümör, tümör şüpheli lezyon görülen hastalara TUR işlemi tekrarlandı. TUR sonucu tümör olan hastalar nüks kabul edildi. Low grade iken high grade tümör görülen hastalar, evre Ta'dan T1'e ve T1'den T2'ye geçen hastalar progresyon olarak kabul edildi. Ayrıca CT'de takipler sırasında perivezikal 1 cm'den büyük lenf nodu görülen, uzak metastaz gelişen ve İVP'de üst üriner sistem tümörü görülen hastalar progresyon olarak değerlendirildi. Hiçbir hastada üst üriner sistem tümörü ve uzak metastaz izlenmedi.

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma) yanı sıra ikili grupların karşılaştırmasında bağımsız t testi, nitel verilerin karşılaştırmalarında ki-kare testi kullanılmıştır. Nüksü ve progresyonu etkileyen faktörleri belirlemede adımsal logistik regresyon analizi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Hastaların ortalama yaşı 62.79 (18-86), ortalama takip süresi 26.84 ay (7-69) idi. Nükse kadar geçen ortalama süre 21.16 ay (4-69), progresyona kadar geçen ortalama süre 25.08 (4-69) aydı. Ortalama tümör sayısı 1.81 (1-8), ortalama tümör boyutu 33.94 mm (5-140) idi. 20 (% 31.7) hastada nüks ve 6 (% 9.5) hastada progresyon görüldü (Tablo 1).

Tablo 1. Demografik veriler.

		n	%
Cinsiyet	Erkek	57	90,5
	Kadın	6	9,5
Grade	Low	45	71,4
	High	18	25,6
WHO	G1	15	23,5
	G2	37	58,7
	G3	11	17,5
CIS	CIS (-)	60	95,2
	CIS (+)	3	4,5
Evre	T1	49	77,5
	Ta	14	22,2
Sol/Papil	Papiller	53	34,1
	Sobd	10	15,9
Tm boyut gr	<30	35	55,6
	>30	25	44,4
Nüks Grup	Düşük	24	35,1
	Orta	35	55,6
	Yüksek	4	6,3
Propresyon Grup	Düşük	23	36,5
	Orta	31	49,2
	Yüksek	9	14,3
HYAL-1	Negatif	41	65,1
	Düşük	5	7,9
	Orta	7	11,1
	Yüksek	10	15,9
Nüks	Nüks (-)	43	68,3
	Nüks (+)	20	31,7
Progresyon	Progresyon (-)	57	90,5
	Progresyon (+)	6	9,5

HYAL-1 boyamasında 41 (% 65.1) spesmen skor 0 (negatif) boyama paterni gösterirken, geriye kalan 22 (% 34.9) spesmen değişik derecelerde pozitif boyama paterni gösterdi. Boya tutan 5 (% 7.9) spesmen skor 1 (düşük), 7 (% 11.1) spesmen skor 2 (orta) ve 10 (% 15.9) spesmen skor 3 (yüksek) boyama paterni gösterdi (Tablo 1).

Nüks gelişen 20 hastanın patolojik incelemesinde, spesimenlerin orta ve yüksek derecede boyanma oranları nüks gelişmeyen hastalara daha yüksekti (% 55 vs % 14, $p=0.005$) (Tablo 2).

Progresyon gelişen 6 hastada, spesimenlerin orta ve yüksek derecede boyanma oranları progresyon gelişmeyen hastalara göre anlamlı derecede daha yüksekti (% 83.30 vs % 21, $p=0.004$) ($p < 0.005$) (Tablo 3).

Tablo 2. HAYL-1 skorlarına göre rekkürens dağılımı.

		Nüks (-)	Nüks (+)	OR (%95 GA)
	Negatif	32 74.40 %	9 45.00 %	
HYAL-1	Düşük	5 11.60 %	0 0.00 %	0.31 (0.16-6.15)
	Orta	3 7.00 %	4 20.00 %	$x^2:12.98$ 4.74 (0.89-25.19)
	Yüksek	3 7.00 %	7 35.00 %	$p=0.005$ 8.29 (1.77-38.77)

Tablo 3. HAYL-1 skorlarına göre progresyon dağılımı.

		Progresyon (-)	Progresyon (+)	OR (%95 GA)
	Negatif	40 70.20 %	1 16.70 %	
HYAL-1	Düşük	5 8.80 %	0 0.00 %	2.45 (0.09-68.10)
	Orta	4 7.00 %	3 50.00 %	$x^2:13,22$ 30 (2.5-360.48)
	Yüksek	8 14.00 %	2 33.30 %	$p=0,004$ 10 (0.81-124.07)

Nüks ve progresyonu etkileyen grade, tümör boyutu, tümör evresi, tümör morfolojisi, EORTC skoru, re-TUR durumu ve HYAL-1 skoru gibi faktörlerin multivariate cox regresyon incelemesinde; HYAL-1 skoru nüksü ve progresyonu öngörmeye en önemli parametre olarak bulundu (nüks için OR: 1.30 (0.09-1.98), % 95 Güven Aralığı, $p=0.047$; progresyon için OR: 1.14 (0.07-1.39, % 95 Güven Aralığı, $p=0.048$).

TARTIŞMA

Yüzeysel mesane kanserindeki prognostik faktörler, tedavi modalitelerini daha iyi yönetmek ve hangi hastaya daha agresif tedavi yöntemini (erken sistektomi) seçmeyi belirlemede klinisyenlere yardımcı olmaktadır. Bir prognostik faktör olarak HYAL-1 düzeyi ve boyanma skorları mesane tümörü dışında diğer tümörlerde de çalışılmıştır. HYAL-1, prostat kanserli hastalarda progresyon gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur ^(11,12).

HYAL-1 düzeylerinin mesane tümörü ile olan ilişkisi bazı çalışmalarda irdelenmiştir. Eissa ve ark. 228 mesane tümörü tanısı konulan hastada idrar HYAL-1 RNA PCR ölçümü değerlendirmiş ve mesane tümörü olan hastaların grade ve evrelerine göre, idrar HYAL-1 RNA PCR oranlarına bakıldığında yüksek evrelerde ve yüksek gradelerde daha yüksek HYAL-1 RNA PCR değerleri olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da HYAL-1 boyanma skorları ile progresyon ve rekürrens arasında pozitif ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Aboughalia AH, 210 hasta ile kontrol grubu da içeren çalışmasında mesane kanserli grupta HYAL-1 ve soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) seviyelerini, ileri evre ve kötü diferansiye tümörlerde yüksek olarak saptamışlardır (p<0.01) ⁽¹⁸⁾. Çalışmamızda doku boyanma skorlarına bakıldığında skorları 2 ve 3 olan 17 hastanın 15 (% 88)'i progresyon ve 14 (% 82)'ü rekürrens açısından orta ve yüksek risk grubundaydı. HYAL-1 boyanma skorlarının yüksek grade ve kötü diferansiye tümörlerde yüksek bulunması rekürrens ve progresyonda yardımcı bir prognostik faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Kramer MW ve ark. yaptıkları 24 ay takipli çalışmada, tümör evresi lenf nodu invazyonu, HYAL-1 ve HAS-1 transkripsiyon seviyesi ve HYAL-1 boyanma skoru gibi faktörlerin metastaz ile bağımsız olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir ⁽¹⁹⁾. Bu çalışmada, HAS-2 ve HYAL-1 ekspresyonu, 6 ay içindeki mesane kanseri nüksünü öngörmede anlamlı

olarak bulunmuştur ⁽¹⁹⁾. Çalışmamızda benzer olarak HYAL-1 boyanma skorları multivariate analiz sonucuna göre hem rekürrens hem de progresyon açısından en önemli parametrelerden biri olarak bulunmuştur.

Mario ve ark. yaptığı çalışmada, yüksek HYAL-1 ekspresyonu invaziv mesane kanserine progresyon gösterecek yüzeysel mesane kanserleri olguları, % 77 doğrulukla tahmin etmiş, ancak rekürrens üzerinde düşük sensitivitesi (% 57) olduğunu göstermişlerdir ⁽²⁰⁾. Çalışmamızda ise HYAL-1 boyanma skorları hem rekürrens hem de progresyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Lokeshwar ve ark. HYAL-1 ekspresyonunun tümör grade ve kas invazivitesi ile ilişkisini göstermiştir ⁽²¹⁾. Çalışmamızda da bu çalışmaya benzer olarak yüksek gradeli tümörlerde HYAL-1 skorlarının yüksek olması, bu tümörlerin invaziv hale geçerek progresyon gösterme riskinin düşük gradeli ve düşük skorlu tümörlere göre arttığını düşündürmektedir.

Kramer ve ark. yaptığı çalışmada HYAL-1 skoru, evre, grade, CIS, multifokalite, yaş gibi faktörlerin çok değişkenli analizinde HYAL-1 ekspresyonunu rekürrens ve progresyon açısından en güçlü prediktör olarak belirlemiştir ⁽¹⁷⁾. Benzer şekilde biz de hasta grubumuzda yaptığımız çok değişkenli analizde HYAL-1 skorunu ve sol rekkürrens ve progresyon üzerinde en etkili faktörler olarak saptadık.

Çalışmamızda, HYAL-1 boyanma skorları 2 ve 3 olan 17 hastanın 15 (% 88)'i progresyon ve 14 (% 82)'ü rekürrens açısından EORTC orta ve yüksek risk grubundaydı. Bu bulgular HYAL-1 ekspresyonunun EORTC progresyon ve nüks risk skorlama sistemi ile paralel olduğunu göstermektedir ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. EORTC orta ve yüksek risk grubunda olan hastalar da HYAL-1 skorlarının bilinmesi tedavi ve takipler için yararlı olabilir. HYAL-1 skoru adjuvan tedavilere, idame tedavilere hatta erken sistektomilere karar verirken yardımcı olacak önemli ve yeni bir parametre olabilir.

SONUÇ

Çalışmamızda, HYAL-1 boyanma skorları mesane tümörlerinde nüks ve progresyonu öngörmeye güvenilir bir prediktör olarak görülmüştür. HYAL-1 ekspresyonunun derecesi ile invazyon arasındaki ilişki bize gri zondaki hasta popülasyonunda idame adjuvan tedaviler ve erken sistektomiler için yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, Witjes JA, Zlotta AR. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009;56(3):430-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2009.06.028> PMID:19576682
2. Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;66(suppl 1):5-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2005.08.064> PMID:16399415
3. Shariat SF, Karam JA, Lerner SP. Molecular markers in bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2008;18:1-8. <http://dx.doi.org/10.1097/MOU.0b013e3282f1c5c1> PMID:18090481
4. Ehdai B, Theodorescu D. Predicting tumor outcomes in urothelial bladder carcinoma: turning pathways into clinical biomarkers of prognosis. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1103-1110. <http://dx.doi.org/10.1586/14737140.8.7.1103> PMID:18588455
5. Tammi RH, Kultti A, Kosma VM, Pirinen R, Auvinen P, Tammi MI. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin Cancer Biol* 2008;18:288-295. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.005> PMID:18468453
6. Simpson MA, Lokeshwar VB. Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. *Front Biosci* 2008;13:5664-5680. <http://dx.doi.org/10.2741/3108> PMID:18508614 PMID:2630716
7. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol* 2000;163:348-356. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)68050-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)68050-0)
8. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer* 2002;95:61-72. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.10652> PMID:12115318
9. Eissa S, Kassim SK, Labib RA, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs. *Cancer* 2005;103:1356-1362. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.20902> PMID:15717321
10. Gomez CB, Gomez P, Knapp J, Jorda M, Soloway MS, and Lokeshwar VB. Hyaluronic acid and HYAL-1 in prostate biopsy specimens: Predictors of biochemical recurrence. *J Urol* 2009;182:1350-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2009.06.070> PMID:19683287 PMID:2828051
11. Posey JT, Soloway MS, Ekici S, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL-1) for prostate cancer. *Cancer Res* 2003;63:2638-2644. PMID:12750291
12. Ekici S, Cerwinka WH, Duncan R, et al. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer. *Int J Cancer* 2004;112:121-129. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20368> PMID:15305383
13. Sanaa E, Menha S, Hanan S, et al. Expression of HYAL1 and Survivin RNA as Diagnostic Molecular Markers for Bladder. *Cancer J Urology* 2010;183:493-498.
14. Kurth K, Denis L, Bouffieux C et al. Factors affecting recurrence progression and in superficial bladder tumours. *Eur J Cancer* 1995;31:1840-1845. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00287-S](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(95)00287-S)
15. Parmar MK, Freedman LS, Hargreave TB et al. Prognostic factors for recurrence and follow up policies in the treatment of superficial bladder cancer: report from the British Medical Research Council Subgroup on superficial bladder cancer (Urological Cancer Working Party). *J Urology* 1989;142:284-288. PMID:2501516
16. Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, non invasive papillary bladder tumors 15-years outcome. *J Urol* 2000;163:60-62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67972-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67972-4)
17. Millan Rodriguez F, Ghechile-Toniola, et al. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol* 2000; 163: 73-78. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)67975-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67975-X)
18. Aboughalia AH. Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. *Arch Med Res* 2006;37(1):109-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.04.019> PMID:16314195
19. Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB. Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer* 2011;117(6):1197-209. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25565> PMID:20960509 PMID:3025265
20. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, Knapp J, Garcia A, Hennenlotter J, Duncan RC, Soloway MS, Jorda M, Kuczyk MA, Stenzl A, Lokeshwar VB. HYAL-1 hyaluronidase: A potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *European Urology* 2010;57:86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2009.03.057> PMID:19345473 PMID:2828527
21. Lokeshwar V, Cerwinka W, Lokeshwar B. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* 2005;65:2243-50. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2805> PMID:15781637