

Servikal Karsinomlarda Anjiogenez, Proliferatif Aktivite ve Epidermal Growth Faktör Reseptör Ekspresyonu*

ANGIOGENESIS, PROLIFERATIVE ACTIVITY AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION IN CERVICAL CARCINOMAS

Esra ÖZKARA¹, Sermin ÖZKAL¹, İknur Bilkay GÖRKEM², Meral KOYUNCUOĞLU¹, Uğur SAYGILI³, Turhan UŞLU³, Oktay ERTEN³

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Servikal karsinomlu hastalarda evre ve tümör derecesi dışında başka prognostik faktörler de önemli rol oynamaktadır. Proliferatif aktivite, anjiogenez ve epidermal growth faktör reseptör (EGFR) ekspresyonu biyolojik davranışı belirleyebilir.

Gereç ve yöntem: Servikal karsinomu 44 hasta histopatolojik prognostik parametreler açısından değerlendirildi ve Ki-67, epidermal growth faktör reseptör ve anjiogenenin stereolojik değerlendirmesi için CD-31 antijenleri immünohistokimyasal olarak uygulandı.

Bulgular: Olguların evre, derece ve histolojik tipleri arasında bir ilişki saptanmadı. Derece ile proliferatif aktivite ve anjiogenez (NVES= Number of Vessels) arasında güçlü bir korelasyon saptandı. Ancak EGFR ekspresyonu ile diğer parametreler arasında (evre, derece, histolojik tip, proliferatif aktivite ve anjiogenez) bir ilişki bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışmada derece ile proliferatif aktivite arasında güçlü bir ilişki saptandı. Bu da proliferatif aktivitenin derece ile birlikte kullanılacak uygun bir prognostik parametre olabileceğini düşündürdü. Ayrıca anjiogenenin de servikal karsinomlarda tümör agresivitesini gösterebileceği şüphesi vardı.

Anahtar sözcükler: Servikal karsinom, anjiogenez, proliferatif aktivite, EGFR ekspresyonu

SUMMARY

Objective: Prognostic parameters other than stage and grade are also playing important roles in patients with cervical carcinoma. Proliferative activity, angiogenesis and epidermal growth factor receptor (EGFR) expression may predict the biologic aggressiveness.

Materials and method: Forty-four patients with cervical carcinoma were evaluated for histopathological prognostic parameters and Ki-67 immunostaining, CD-31 for stereological assessment of angiogenesis and epidermal growth factor expression were performed.

Results: There was no correlation between stage, grade and histologic typing. There was a significant relation between grade and proliferative activity and angiogenesis.

Esra ÖZKARA

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

35340 Inciraltı İZMİR

Tel: 0 (232) 4123447

Faks: 0 (232) 2777274

e-posta:ozkaraesra@hotmail.com

* Bu çalışma 1-5 Mayıs 2002 tarihleri arasında Antalya'da yapılan VIII. Jinekolojik Onkoloji Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

No relation was found between EGFR expression and the other parameters (stage, grade, histologic typing, proliferative activity and angiogenesis).

Conclusions: In this study, we found significant correlation between grade and proliferative activity. So proliferative activity is a useful prognostic parameter that can be evaluated with histologic grade. Also angiogenesis might indicate tumour aggressiveness in servikal carcinomas.

Key words: Cervical carcinoma, angiogenesis, proliferative activity, EGFR expression

Servikal kanserlerde klinik evre, tedaviye yanıt ve klinik gidişi göstermede en önemli parametredir. Ancak klinik evre her zaman tek başına hastaların prognozlarını göstermede yararlı olamamaktadır. Evre yanısıra tümör volümü, tümör derecesi, damar invazyonu ve histolojik tip gibi diğer klinik ve histolojik parametreler prognostik gösterge olarak kabul edilmektedir (1).

Günümüzde bu parametreler dışında çeşitli onkogenler, tümör süpresyon genleri, adhezyon molekülleri, anjiogenez, proliferasyon faktörleri gibi prognozun belirlenmesi ve tedavinin yönlendirilmesine katkıda bulunacak daha objektif ve kesin parametreler üzerinde çalışılmaktadır.

Anjiogenez yeni damar oluşumu anlamına gelmektedir (2,3). Anjiogenez büyüme, fertilitate ve yara iyileşmesi dışında normal fizyolojik bir durum değildir ve birçok hastalığın patolojisinde yer almaktadır (2-5). Anjiogenezin değerlendirilebilmesi için öncelikle mikrodamarların görülebilir hale getirilmesi gerekmektedir. Bu da ancak endotel hücrelerinin immünohistokimyasal yöntemle boyanması ile mümkün olabilmektedir. Bunun için faktör VIII ilişkili antijen, CD-31, CD-34, CD-36 antijenleri kullanılabilir (2). Daha sonra da mikrodamar yoğunluğu morfometrik yöntemlerle ölçülebilir.

Anjiogenetik aktivitenin birçok tümörde prognostik bir gösterge olduğu gösterilmiştir. Servikal tümörlerde de anjiogenezle ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bunların bir kısmında derece, evre ya da nüklelerle ilişkisi saptanmıştır (6-12).

Ki-67 antijeni; hücrenin mitoz, G1, S ve G2 fazında salgılanan ve proliferatif aktivitenin belirlenmesinde kullanılabilen güvenilir bir antijendir (13).

Serviks kanserlerinde daha düşük proliferatif aktivitenin rekurrent/rezidüel tümörle ilişkili olduğu ve proliferatif aktivitenin prognostik gösterge olabileceğini gösteren çalışmalar vardır (14-17).

Epidermal growth factor reseptörü (EGFR); bir transmembran glikoprotein reseptörüdür. Hücre bölünmesinde ve DNA replikasyonunda rol oynar. Artmış ekspresyonu tümörlerde hücre proliferasyonu ile ilişkilidir ve bu reseptör pozitif olan hastalara, negatif olanlara göre daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmektedir (18).

Bu çalışmada servikal karsinomlarda anjiogenez, proliferatif aktivite ve EGFR ekspresyonunun, kabul edilen prognostik parametreler (evre, tümör derecesi, histolojik tür) ile ilişkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgu Seçimi:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında tanı almış 44 adet olgu çalışma kapsamına alındı. Bu olgulara ait klinik bilgiler (yaş, evre, tümör derecesi, histolojik tür) patoloji arşivine ait raporlar yardımıyla elde edildi. Evreleme için FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics Staging for Carcinoma of the Cervix Uteri) evreleme sistemi kullanıldı.

Immünohistokimya:

Immünohistokimyasal boyama için olguların hematoxilen-eozin preparatlarından tümör ve tümör komşuluğunu örnekleyen uygun parafin bloklar seçildi. Hazırlanan kesitlerde anjiogenez değerlendirme için CD-31(Neomarkers MS-353-S1;1:50 dilüsyon), proliferatif aktiviteyi değerlendirmek için Ki-67 antijeni (Neomarkers MS-1006-A0; 1:100 dilüsyon) ve ayrıca epidermal growth factor reseptör antijeni (Neomarkers

MS-378-P0;1:50 dilüsyon) streptavidin-avidin immün-peroksidaz yöntemiyle çalışıldı.

CD-31 antijeni ile vasküler yapıları döşeyen endotel hücreleri görülebilir hale getirildikten sonra (Resim 1) morfolojik olarak Vasküler Yüzey Yoğunluğu (VSD= Vascular Surface Density), mikrodamar sayısı (NVES= Number of Vessels) hesaplandı. Bu kesitler ışık mikroskopisinde, 100x'lik büyütmede sabitlendi, bununla bağlantılı kamera (Sony CCD, Japan) ile monitöre (Sony Trinitron, Japan) yansıtıldı ve böylece 525x'lik bir büyütme elde edildi. Daha sonra 11 yatay, 11 dikey test çizgilerinden oluşan 121 nokta içeren karelerden oluşan saydam monitöre yerleştirildi. Bu saydam sınırları içinde kalan tümör dokusunda test çizgileriyle kesişen damarların kesişme nokta sayıları (In), bu alan içinde kesişsin veya kesişmesin toplam damar sayısı (N) olarak not edildi. $V_v(\text{str})$; test çizgisi üzerindeki stromanın volüm oranını göstermekte olup nokta sayma yöntemiyle belirlendi ($V_v(\text{str})$; stromaya düşen nokta sayısının 121'e bölünmesiyle) elde edildi. Aynı işlem tümörün rastgele seçilen 10 farklı alanında yinelenildi. VSD, NVES aşağı-

daki formüllere göre hesaplandı (19-21):

$$1\text{-VSD (Vasküler Yüzey Yoğunluğu)} = \sum I_{n \times 2} / L_r * x V_v(\text{str})$$

$$2\text{-NVES (Mikrodamar Sayısı)} = N / V_v(\text{str})$$

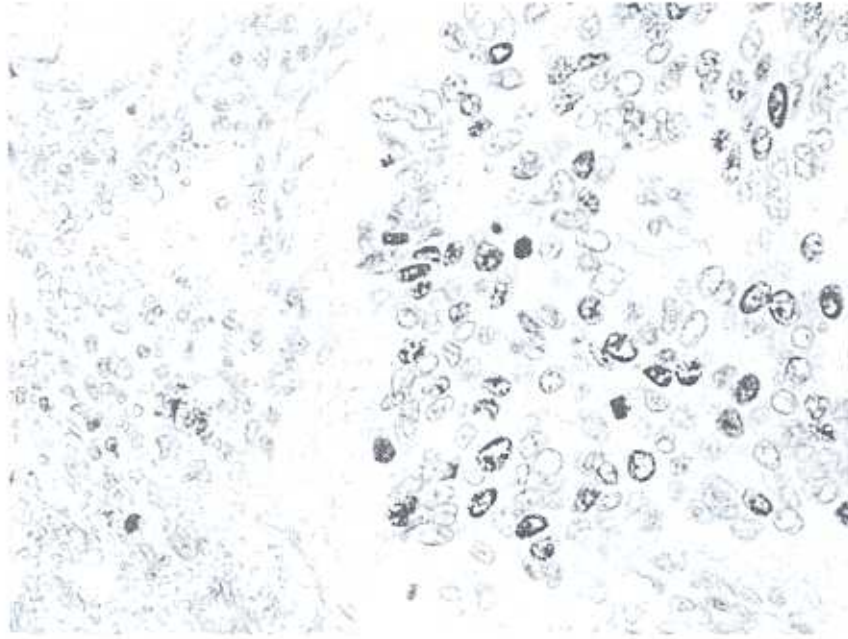
Ki-67 için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı ve nükleer boyanma olumlu kabul edildi. Boyanmanın en yoğun olduğu alanlarda 500-1000 hücre sayılarak proliferatif aktivite yüzde olarak hesaplandı (22) (Resim 2).

EGFR için pozitif kontrol olarak daha önceden pozitif boyandığı bilinen meme karsinomuna ait bir kesit kullanıldı. EGFR ile membranöz boyanma olumlu kabul edildi; boyanma yaygınlığı ve boyanma yoğunluğu 0-7 arasında skorlandı. Boyanma yaygınlığı: Boyanma yoksa 0; %1-25 ise 1; %26-50 ise 2; %51-75 ise 3; %76-100 ise 4 olarak değerlendirildi. Boyanma yoğunluğu: Boyanma yoksa 0; zayıf ise 1, orta derece ise 2 ve güçlü ise 3 olarak skorlandı. Daha sonra bu sonuçlar toplanmış ve toplam skor 0 ise negatif; 2-3 ise zayıf; 4-5 ise orta derece; 6-7 ise güçlü olarak değerlendirildi (23)(Resim 3).



Resim 1. CD-31 ile görülebilir hale getirilen vasküler yapılar (100X)

* L_r (sabit sayı): 10,34

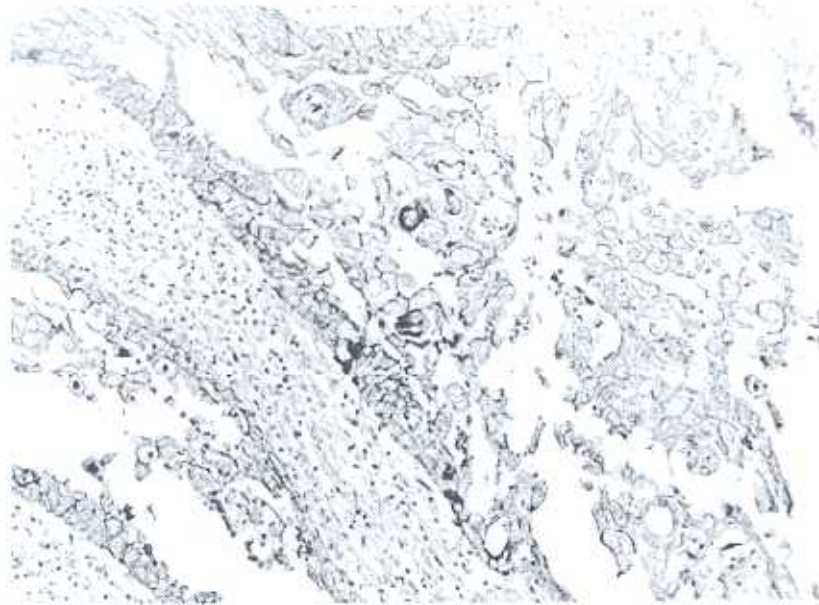


Resim 2. Ki-67 ile tümör hücrelerindeki olumlu nükleer boyanma (400X)

İstatistik:

İstatistiksel analiz bilgisayarda SPSS (Scientific Package for Social Sciences) programı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen VSD, NVES, proliferatif aktivite yüzdesi ve EGFR ekspresyon değerleri ile olguların yaş, histolojik tür, derece, evre değerleri tek değişkenli

analizde χ^2 , tek yönlü ANOVA testleri ile karşılaştırıldı. 0,05'e eşit ya da küçük "p" değerleri anlamlı kabul edildi. Buradan anlamlı sonuç elde edilen değerlere ise Kendall's tau b testi ile korelasyon testi uygulandı ve "r" değerleri elde edildi.



Resim 3. EGFR ile tümör hücrelerindeki güçlü membranöz boyanma (100X)

SONUÇLAR

Çalışma kapsamına alınan 44 adet servikal karsinom olgusunun yaşları 33-67 arasında değişmekte idi (ortalama yaş $50,19 \pm 8,51$). Olguların 29'u non-keratinize skuamöz hücreli karsinom, 12'si keratinize skuamöz hücreli karsinom, 2'si papiller skuamöz hücreli karsinom ve 1'i ise adenokarsinomdu. Olguların histolojik türleri ile diğer parametreler arasında istatistiksel bir ilişki saptanmadı.

Olgular FIGO evrelemesine göre evrelendirildi ve evre derece dağılımları Tablo'da gösterildi. Bir olguda insizyonel biyopsi olduğu için evreleme yapılamadı. Evre ile derece arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo. Olguların FIGO evre ve derece dağılımları

Derece	Evre 1	Evre 2	Evre 3
1	10	1	2
2	16	10	0
3	2	2	0
N	28	13	2

* Bir olguda insizyonel biyopsi alınması nedeniyle evreleme yapılamamıştır.

Olguların VSD değerleri 4,5-132,50 arasında olup; ortalama $20,83 \pm 25,48$ mm⁻³'dür. NVES değerleri 21-725 arasında olup; ortalama NVES değerleri ise $95,99 \pm 119,02$ mm⁻²'dir. NVES ile tümörlerin dereceleri arasında anlamlı bir istatistiksel ilişki saptandı ($p=0,009$; tek yönlü ANOVA). Ayrıca NVES ile Ki-67 indeksi arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı ($p=0,041$; tek yönlü ANOVA). VSD değerleri ile diğer değişkenler arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Ki-67 indeksi ile ölçülen ortalama proliferatif indeks %65,62'dir. Ki-67 değerleri ile derece arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0,0001$; tek yönlü ANOVA). Ayrıca Kendall's tau b testinde analizimde doğrusal bir ilişki görüldü ($r=0,674$). Ki-67 ile evre, histolojik tür, EGFR ekspresyonu ve VSD arasında bir ilişki bulunamadı.

Ortalama EGFR ekspresyon skoru 3,40'tir. EGFR ekspresyonu ile yaş, evre, derece, anjiogenez ve

proliferatif aktivite arasında bir ilişki saptanmadı (tek yönlü ANOVA ve χ^2 testi).

TARTIŞMA

Anjiogenez gerek servikal intraepitelyal neoplazi (GIN) gerekse invaziv skuamöz hücreli karsinomlarda birçok araştırmaya konu olmaktadır. Dobbs ve ark (9); CIN'lerde ortalama damar yoğunluğu ve vascular endothelial growth factor ekspresyonunun displazinin derecesi arttıkça ve invaziv skuamöz hücreli karsinoma doğru ilerledikçe arttığı ve hastaların küçük bir grubunda rekurrensle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Yine aynı araştırmacılar başka bir çalışmada servikste normal epitelten displastik epitele ve karsinoma doğru ilerlemede mikrodamar yoğunluğunun arttığını ileri sürmüşlerdir (9,24). Ayrıca mikrodamar yoğunluğunun noninvaziv tümörden mikroinvaziv tümöre ilerledikçe anlamlı olarak arttığı, ancak rekurrensleri göstermek açısından yetersiz olduğunu öne süren çalışmalar da vardır (10). Diğer bir çalışmada ise servikal skuamöz hücreli karsinomlarda anjiogenezin tümör büyüklüğü ve evre ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11).

Bizim çalışmamızda olguların mikro damar sayıları (NVES) ile tümör derecesi ve proliferatif aktivite arasında anlamlı bir ilişki bulundu. Bunun da tümörün agresif davranışı ile ilişkili bir bulgu olduğu düşünüldü. Ancak evre ile anjiogenez arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. İleri evre (FIGO Evre III) olguların çalışma kapsamına alınmasının bu sonuçta önemli olduğu düşünüldü. Çünkü anjiogenez genellikle non-invaziv tümörlerden invaziv tümörlere geçişte ve tümörlerin erken evrelerinde önem kazanmaktadır (6,7,9-12).

Ki-67 antijeni hücrenin mitoz, G1, S ve G2 fazında salgılanan ve proliferatif aktivitenin belirlenmesinde kullanılabilecek güvenilir bir antijendir (13).

Pillai ve ark (14); serviks kanserlerinde daha düşük proliferatif aktivitenin rekurrent/rezidüel tümörle ilişkili olduğu ve proliferatif aktivitenin prognostik gösterge olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Servikal intraepitelyal neoplazilerde (GIN) derece arttıkça Ki-67 boyanma indeksinin arttığı ve invaziv skuamöz hücreli karsinomlarda ise boyanmanın daha

yaygın olduğu bildirilmektedir (15,25). Ayrıca birçok çalışmada gerek servikal karsinomlarda gerekse diğer organ tümörlerinde proliferatif aktiviteyle tümör derecesi arasında güçlü bir korelasyon olduğu vurgulanmaktadır (13-17,25). Bizim çalışmamızda da olguların histopatolojik dereceleri ve proliferatif aktiviteleri arasında güçlü bir korelasyon saptandı. Proliferatif aktivite yüzde olarak hesaplandığı için tümör derecesine göre daha objektif bir göstergedir. Bu nedenle tümörlerin biyolojik davranışlarını göstermede daha yararlı bir yöntem olmaya adaydır.

Genç hastalarda lokal ilerlemiş servikal karsinomların daha agresif davranışlarının yüksek proliferasyon indeksi ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır (16). Bununla birlikte proliferatif aktivitenin servikal kanserlerde yaşam süresini göstermek açısından yetersiz olduğu düşünülmektedir (11). Diğer bir çalışmada ise Ki-67 değerlerinin servikal adenokarsinomlarda rekurrensleri gösterebilecek bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (17).

Epidermal growth factor reseptörünün (EGFR) artmış ekspresyonu tümörlerde hücre proliferasyonu ile ilişkilidir ve bu reseptör pozitif olan hastaların, negatif olanlara göre daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmektedir (18,23).

Servikal karsinomlarda da EGFR ekspresyonunun tümörün yayılımı ile ilişkili olduğu, bağımsız bir prognostik faktör olduğu ve özellikle bir tümör belirleyicisi olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Kersemackers ve ark (23) ise EGFR ekspresyonunun servikal kanserlerde kötü prognozla ilişkili olduğu ve lenf nodu durumundan bağımsız olarak prognostik bir gösterge olduğu sonucuna varmışlardır.

Maruo ve ark (28) EGFR ekspresyonunun servikal skuamöz epitelde bulunmasının neoplastik transformasyonla ilişkili olduğunu ve bir tümör belirleyicisi olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Kersemackers ve ark (23) ise EGFR ekspresyonunun servikal kanserlerde kötü prognozla ilişkili olduğu ve lenf nodu durumundan bağımsız olarak prognostik bir gösterge olduğu sonucuna varmışlardır.

Bizim çalışmamızda ise EGFR ekspresyonuyla diğer parametreler arasında bir ilişki saptanmadı.

Kristensen ve ark (1) da EGFR ekspresyonu ile tümör boyutu, lenfatik invazyon ve lenf nodu tutulumu arasında bir korelasyon saptamamışlardır. Hale ve ark ise (29) çalışmalarında skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve adenoskuamöz karsinomlu olguları eş sayıda çalışmışlar ve en belirgin boyanmayı adenoskuamöz karsinomlarda saptamışlardır. Skuamöz hücreli karsinomlarda ise EGFR ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamsız olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada yalnızca bir adet adenokarsinom bulunmasını ve diğer tümörlerin skuamöz hücreli karsinomun alt türleri olmasının önemli olabileceği düşünülmüştür. Yine de bizim olgularımızın klinik izlem verilerinin bulunmamasının olumsuz bir faktör olması daha muhtemeldir.

Bu çalışmada servikal karsinomlarda bilinen prognostik parametrelerle proliferatif aktivite, anjiogenez ve EGFR ekspresyonunun ilişkisi araştırılmıştır. Proliferatif aktiviteyle tümör derecesi arasında güçlü bir korelasyon saptanması oldukça önemli bir bulgudur. Daha objektif bir gösterge olması nedeniyle gelecekte tümör derecesinden daha değerli bir kriter olmaya adaydır. Anjiogenez ise tümörlerin agresif davranışlarıyla oldukça yakından ilişkilidir ve bu çalışmada da tümör derecesi ve proliferatif aktiviteyle ilişkili bulunmuştur. Yine de hem anjiogenez ve proliferatif aktivite hem de EGFR ekspresyonu için olgu sayısı artırılarak ve olguların klinik izlemleri de eklenerek daha kapsamlı bir çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. Bunlardan elde edilen sonuçlarla olguların izlemleri ve tedavi planlarını daha objektif kriterlerle belirlenebileceği umulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen DEÜ Araştırma Fonuna ve ayrıca projenin yapılma aşamasında değerli bilgilerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Emek ÖZEN'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG. Evaluation of the Prognostic Significance of Cathepsin D, Epidermal Growth Factor Receptor, and c-erbB-2 in Early Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* 1996; 78: 433-440.

2. Craft PS, Harris AL. Clinical Prognostic Significance of Tumour Angiogenesis. *Annals Oncol* 1994; 5: 305-311.
3. Norrby K. Angiogenesis: New Aspects Relating to Its Initiation and Control. *APMIS* 1997; 105: 417-437.
4. Campbell SC. Advances in Angiogenesis Research: Relevance to Urological Oncology. *J Urol* 1997; 158: 1663-1674.
5. Köhler HH, Barth PJ, Siebel A, Gerharz FW, Birtinger A. Quantitative Assessment of Vascular Surface Density in Renal Cell Carcinomas. *Br J Urol* 1996; 77: 650-654.
6. Kodama J, Yoshinouchi M, Seki N. Angiogenesis and Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase Expression in Cervical Cancer. *Int J Oncol* 1999; 15:149-154.
7. Abulafia O, Friest WF, Sherer DM. Angiogenesis in Malignancies of the Female Genital Tract. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 220-231.
8. Di Leo S, Caschetto S, Garozzo G. Angiogenesis as a Prognostic Factor in Cervical Carcinoma. *Eur j Gynecol Oncol* 1998; 19:158-162.
9. Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR. Angiogenesis Is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression in cervical Intraepithelial Neoplasia. *Br J Cancer* 1997; 76:1410-1415.
10. Tjalma W, Sonnenmans H, Weyler J. Angiogenesis in Cervical Intraepithelial Neoplasia and The Risk of Recurrence. *Am J Obstet gynecol* 1999; 181:554-559.
11. Avall EH, Silversward C, Aspenblad U. The Impact of Tumour Angiogenesis, p53 overexpression and Proliferative activity (MIB-1) on Survival in Squamous cervical Carcinoma. *Eur J Cancer* 1997; 33:1799-1804.
12. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J. Angiogenesis in Uterine Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16: 335-338.
13. Joehum W, Schröder S, Al-Taha R. Prognostic Significance of Nuclear DNA Content and Proliferative Activity in Renal Cell Carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 514-521.
14. Pillai MR, Jayaprakash PG, Nair MK. Tumour-proliferative Fraction and Growth Factor Expression as Markers of Tumour Response to Radiotherapy in Cancer of the Uterine Cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124: 456-461.
15. Mc Cluggage WG, Maxwell P, Bharucha H. Immunohistochemical Detection of Metallothionein and MIB-1 in Uterine Cervical Squamous Lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17: 29-35.
16. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G. MIB-1 Immunostaining in Cervical Carcinoma of Young Patients. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 184-187.
17. Morimura Y, Yanagida K, Hashimoto T. Evaluation of Immunostaining for MIB-1 and nm23 Products in Uterine Cervical Adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med* 1998; 185: 185-197.
18. Moch H, Sauter G, Buchholz N. Epidermal Growth Factor Receptor Expression is Associated with Rapid Tumor Cell Proliferation in Renal Cell Carcinoma. *Hum Pathol* 1997; 28: 1255-1259.
19. Barth PJ, Weingartner K, Köhler HH, Birtinger A. Assessment of the Vascularization in Prostatic Carcinoma: A Morphometric Investigation. *Hum Pathol* 1996;27: 1306-1310.
20. Yörükoğlu K, Sağol O, Özkara E, Mungan U, Kırkalı Z. Comparison of Microvascularization in Diagnostic Needle Biopsies and Radical Prostatectomies in Prostate Carcinoma. *Eur Urol* 1999; 35: 109-112.
21. Ak D, Çanda T, Erken Evre İnvaziv Duktal Karsinomlarda Anjiyogenez ve Fibronektin Ekspresyonunun Lenf Düğümü Metastazi ile İlişkisi ve Prognostik Önemi. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 1999; 5: 91-98.
22. Kırkalı Z, Yörükoğlu K, Özkara E, Kazımoğlu H, Mungan U. Proliferative Activity, Angiogenesis and Nuclear Morphometry in Renal Cell Carcinoma. *Int J Urol* 2001; 8: 697-703.
23. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Van den Broek LJ. Oncogene Alterations in Carcinomas of the Uterine Cervix: Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor is Associated with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 577-586.
24. Dobbs SP, Brown LJ, Ireland D, Abrams KR, Murray JC. Platelet-derived endothelial growth factor expression and angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of cervix. *Ann Diagn Pathol* 2000; 4: 286-292.

25. Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhorst J, Gaidal F. Assessment of EGFR and TGF-alpha expression in Relationship to HPV Status and Ki-67 Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasms. *Int J Cancer* 1996; 69: 165-169.
26. Boiko IV, Mitchell MF, Hu W. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia and its Modulation During an Alpha-difluoromethylornithine Chemoprevention Trial. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1383-1391.
27. Pfeiffer D, Kimming R, Herrmann J. Epidermal Growth Factor Receptor Correlates Negatively with Cell Density in Cervical Squamous Epithelium and is down-regulated in Cancers of the Human Uterus. *Int J Cancer* 1998; 79: 49-55.
28. Maruo T, Yamasaki M, Ladines-Llave CA, Mochizuki M. Immunohistochemical Demonstration of Elevated Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in the Neoplastic Changes of Cervical Squamous Epithelium. *Cancer* 1992; 69: 1182-1187.
29. Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ, Fox H, Williams J, Wilcox FL. Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Cervical Carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 149-153.