

LARENKS KANSERİNDE ANJİOGENEZİN P53, HİSTOLOJİK DERECE VE NODAL METASTAZ İLE KORELASYONU

CORRELATION OF ANGIOGENESIS TO P53, HISTOLOGICAL GRADE AND NODAL METASTASIS IN LARYNGEAL CANCER

Dr. Sema HÜCÜMENOĞLU (*), Dr. Altuğ ÖZAĞAR(**), Dr. Mahmut HÜCÜMENOĞLU (***),
Dr. Gülben ERDEM (****), Dr. Gerçek İ. ŞİRİNER (***)

ÖZET: Larenks skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda mikro damar yoğunluğunun bölgesel lenf nodu metastazı, p53 ekspresyonu ve histolojik dereceye (grade) korelasyonunun değerlendirilmesi amaçlandı. 1997-1999 yılları arasında hastanemizde opere olup halen takipte bulunan 27 larenks skuamöz hücreli karsinomlu hasta çalışmaya alındı. Parafin kesitler CD-31 ve p53 ile immünohistokimyasal olarak boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi. CD-31 ekspresyonu; p53 ekspresyonu (spearman's rho, $p=0.877$) ve histolojik derece (spearman's rho, $p=0.774$) ile korele bulunmadı. CD-31 ekspresyonu bölgesel nodal metastaz riskiyle güçlü korelasyon gösterdi (spearman's rho, $p=0.009$), preoperatif palpasyonla nodal durumla birlikte değerlendirildiğinde ayırıcı idi (lojistik regresyon, CD-31 için ayırıcı değer = 27.3, $p = 0.0334$). CD-31 değerinin 27.3'ün üzerinde olduğu ve palpabl lenf nodu bulunan 12 hastanın 10'unda (83.33%) bölgesel lenf nodu metastazı gelişti. CD-31 değerinin 27.3'ün altında olduğu ve palpabl lenf nodu bulunmayan 15 hastanın hiçbirinde (0.00%) bölgesel lenf nodu metastazı izlenmedi. CD-31 değerleri bölgesel lenf nodu metastazı riskiyle güçlü korelasyon göstermektedir. Mikrodamar yoğunluğunun düşük olduğu ve boyunda palpabl nod bulunmayan (No) olgularda selektif boyun diseksiyonuna alternatif tedavi metodlarının dikkate alınması gerektiği kanaatindeyiz-

Anahtar Sözcükler: Larenks karsinomu, anjiogenez, p53

SUMMARY: In Our purpose was to determine the correlation of microvessel density to regional lymph node metastasis, p53 expression and histological grade in patients with squamous cell laryngeal carcinoma. 27 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who were operated in our hospital in 1997-1999 period and are still on follow-up were included in this study. Paraffin-embedded sections were immunostained for CD-31 and p53 and were evaluated under light-microscope. CD-31 expression was correlated to neither p53 expression (spearman's rho, $p=0.877$) nor histological grade (Spearman's rho, $p=0.774$). CD-31 expression was strongly correlated to regional lymph node metastasis risk (spearman's rho, $p=0.009$), and if taken together with the palpable lymph node status, 27.3 was the cut of value (logistic regression, $p=0.0334$). There were 12 patients with the CD-31 values higher than 27.3 and had palpable lymph nodes, 10 of which had regional lymph node metastasis (83.33%). There were no regional lymph node metastasis in 15 patients who had CD-31 values lower than 27.3 and who didn't have any palpable lymph nodes (0.00%). CD-31 values are strongly correlated to regional lymph node metastasis risk. In patients with a low microvessel density and who do not have palpable lymph nodes on the neck, therapeutical methods that are alternative to selective neck dissection are needed to be considered.

Key Words: Laryngeal carcinoma, angiogenesis, p53

GİRİŞ

Larenks yassı hücreli karsinomlu hastalarda en belirgin prognostik indikatör servikal nod metastazıdır. Baş-boyun tümörlerinin tedavisini yönlendirmede temel dayanak American Joint Comitee on Cancer'ın TNM evreleme sistemidir. Tümör büyüklüğü, lokalizasyonu ve temiz cerrahi sınırlar yine prognostik öneme sahiptir (14). Yeni geliştirilmiş prognostik

(*) SSK Ankara Eğitim Hastanesi Patoloji Bölümü

(**) SSK.Ankara Eğitim Hastanesi 1. KBB Kliniği

(***) SSK Ankara Eğitim Hastanesi 2. KBB Kliniği
ANKARA

(****)SSK İstanbul Eğitim Hastanesi Patoloji Bölümü
İSTANBUL

indikatörler ise p53 ekspresyonu (8,13,10,1,16) ve anjiogenez yaygınlığıdır (5).

P53 gen mutasyonu larenks karsinogenezinde erken bir olaydır ve p53 immünohistokimyasal analizi, larenksin kanseröz ve prekanseröz lezyonları için tanısal sensitiviteyi artırır (13,7). Yine p53 ekspresyonu larenks kanserli hastalarda kemoterapi ve radyoterapiye artmış cevap ile ilişkilidir (1).

Mikrodamar yoğunluğu ve metastaz riski arasında belirgin korelasyon olduğu bildirilen tümörler; non small cell akciğer (127), prostat (19), meme (8) ve baş-boyun kanserleridir (9). Anjiogenez; larenks kanserli hastada artmış metastaz riski ile ilişkili olmanın yanında, lenf nodu negatif olan vakalarda rekürrens tek istatistiksel olarak belirgin öngörenidir (14).

YÖNTEM VE GEREÇLER

1997-1999 yılları arasında hastanemiz patoloji kliniğinde skuamöz hücreli karsinom tanısı almış, KBB kliniklerinde larenjektomi ve boyun diseksiyonu ile tedavi edilmiş olup halen takibimizde bulunan 27 olgu çalışıldı. Hasta kayıtları incelenerek standart demografik bilgiler, preoperatif palpasyonla nodal durum, patolojik spesimende metastatik nodal tutulum, histolojik derece (grade) belirlendi. Parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlıktaki kesitler hematoksilin-eosin ve immünohistokimyasal olarak p53 ve CD-31 boyandı ve ışık mikroskobu altında incelendi.

Mikrodamar yoğunluğunun tespiti için monoklonal anti-CD31 (1:80; Dako Corporation), p53 için monoklonal anti-p53 (Dako Corp.) antikoları kullanıldı. Kesitler deparafinize ve rehidrate edildi, immüno-boyama öncesi 20 dakika süreyle sitrat tamponunda buharlandı ve 5 dakika soğutuldu. Tüm dokular bloke eden antikorla 5 dakika, primer antikorla 25 dakika, biotinlenmiş sekonder bağlanan antikorla 25 dakika, hidrojen peroksit solüsyonuyla 7.5 dakika, avidin-biotinlenmiş enzim kompleksiyle 25 dakika, kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) ile 15 dakika, kontrast boyama için hematoksilin ile 1 dakika muamele edildi. Bu inkübasyonlar oda ısısında gerçekleştirildi, inkübasyonlar arasında kesitler tamponla yıkandı. Tümör içerisindeki stromada vasküler açıdan zengin olduğu belirlenen 3 farklı alanda (x40 objektif, x10 oküler, 0.152 mm²) mikrodamar sayımı yapıldı. Küme şeklinde bulunan ve tek endotel hücre-

leri-lümen içersin içermesin-değerlendirmeye alındı. Boyanmış olan plazma hücreleri değerlendirme dışı bırakıldı. Her olgu için ortalama mikrodamar sayısı belirlendi. Kontrol olarak tümöre bitişik normal alanlar incelendi. P53 değerlendirmesi yarı kantitatif yöntemle (+,++,+++) yapıldı. Nükleusların hiç boyanmadığı olgularda p53 negatif kabul edildi. Nükleusların 10% nun altında, %10 ile %20 arasında ve %20 nin üstünde boyanma gösterdiği olgularda p53 pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analizde mikrodamar verileri iki şekilde incelendi. Önce mikrodamar yoğunluğu devamlı değişken olarak alındı ve Spearman's rho tekniği kullanılarak iki uçlu (dichotomous) verilerle ifade edilen histolojik derece, p53 boyanma durumu, palpasyonla nodal durum ve metastatik bölgesel lenf nodu durumuna korelasyonu hesaplandı. Sonra bölgesel lenf nodu metastazı gelişen ve gelişmeyen gruplar arasında maksimum ayrımı sağlayan ayırıcı değeri (cut-off value) hesaplamak için mikrodamar verilerini iki uçlu (dichotomous) değerlendiren lojistik regresyon modeli kullanıldı. En yüksek benzerlik (likely-hood) değerini veren modeller tanındı ve Wald testi kullanılarak en küçük p değerine sahip model bulundu. Bu modelde optimum ayırıcı değer (cut-off value) ortaya çıktı. Takip süresi kısa olduğu için nüks verileri istatistik çalışmaya alınmadı.

BULGULAR

Olguların yaş ortalaması 53'tü ve tamamı erkekti. Histolojik derece 16 hastada yüksek, 11 hastada düşüktü. 7 hastada boyunda palpabl nod mevcuttu. P53 boyanan olgu sayısı 8 idi. Olguların CD-31 değerlerinin ortalaması 24.6 idi. Takip süresi ortalama 17.2 haftaydı. 3 olguda nüks gelişti, bunlardan biri eksitus oldu (Tablo 1). Bölgesel nodal metastaz durumuyla anlamlı korelasyon gösteren veriler CD-31 değerleri (Spearman's rho, p=0.009) ile palpasyonla nodal durum verileri (Spearman's rho, p=0.009) idi. CD-31 ekspresyonu ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi (Spearman's rho, p=0.877). (Resim 1,2,3,4) P53 ekspresyonu ile nodal metastaz arasında anlamlı ilişki bulunamadı (Spearman's rho, p=0.653). CD-31 ekspresyonu ile histolojik derece arasında anlamlı korelasyon yoktu (Spearman's rho, p=0.774). CD-31 ekspresyonu ile nodal metastaz arasında anlamlı korelasyon bulundu (Spearman's rho, p=0.009), fakat

CD-31 düzeyi ayırdedici değildi. Bunun yanında CD-31 düzeyi, klinik olarak palpabl nod durumuyla beraber değerlendirildiğinde metastaz riski için ayırdedici bulundu. CD-31 için ayırdedici olduğu hesaplanan 27.34 'ün (lojistik regresyon, $p = 0.0334$) altındaki damar sayımına sahip ve palpabl lenf nodu bulunmayan hastaların hiçbirinde metastatik lenf

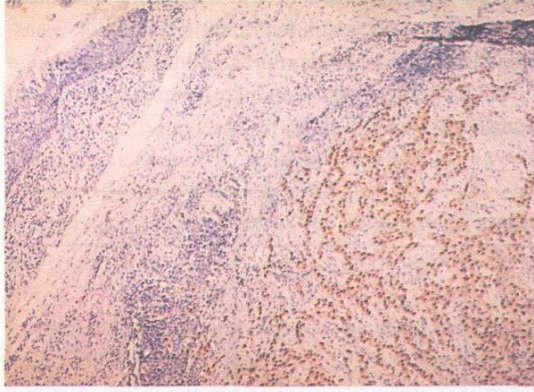
nodu izlenmedi. Damar sayımı 27.3'ün üstünde olduğu ve palpabl lenf nodu bulunan hastaların 83.33%'ünde metastatik lenf nodu tespit edildi. 2 hastada (16.66%) damar sayımı 27.3'ün üzerinde olduğu ve palpabl lenf nodu bulunduğu halde metastatik lenf nodu saptanmadı (Tablo 2).

CD-31 A	CD-31 B	CD-31 C	CD-31 ORT	p53	H.derece	palp. nod	met. nod	nüks	eks
23	20	30	24,2	yok	düşük	yok	yok		
56	63	46	55	yok	yüksek	var	var		
36	24	20	26,6	var	yüksek	yok	yok		
14	16	5	11,6	yok	düşük	var	yok		
16	8	15	13	var	yüksek	var	var		
12	9	10	10,3	yok	yüksek	yok	yok		
25	35	21	27	yok	yüksek	var	var		
10	12	12	11,3	yok	düşük	yok	yok		
33	18	31	27,3	var	düşük	yok	yok		
19	21	24	21,3	yok	yüksek	yok	yok		
22	15	16	17,6	yok	yüksek	yok	yok		
26	16	25	22,3	yok	düşük	yok	var	(+)	(+)
9	5	5	6,3	yok	yüksek	yok	yok		
32	34	37	34,3	yok	düşük	yok	yok		
22	14	29	21,6	yok	düşük	yok	yok		
21	16	15	20,6	var	düşük	yok	yok		
40	69	48	52,3	yok	yüksek	yok	var	(+)	
24	29	21	24,6	var	düşük	yok	yok		
27	30	31	29,3	yok	yüksek	yok	yok		
34	43	42	39,6	yok	yüksek	yok	var	(+)	
47	13	18	26	yok	yüksek	yok	var		
21	22	19	20,6	yok	yüksek	yok	yok		
19	19	18	18,6	var	yüksek	var	var		
37	35	21	31	yok	yüksek	yok	var		
25	25	18	22,6	var	düşük	yok	yok		
19	30	19	22,6	yok	yüksek	var	var		
33	27	23	27,6	var	düşük	var	var		

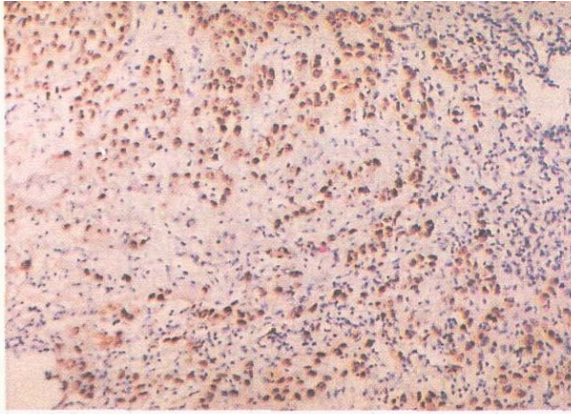
Tablo 1: Çalışılan Parametreler ve Sonuçlar

	METASTATİK LENF NODU VAR	METASTATİK LENF NODU YOK
CD-31 DEĞERİ 27,3 TEN YÜKSEK VE PALPABL LENF NODU VAR	10 OLGU	2 OLGU
CD-31 DEĞERİ 27,3 TEN AZ VE PALPABL LENF NODU YOK	0 OLGU	15 OLGU

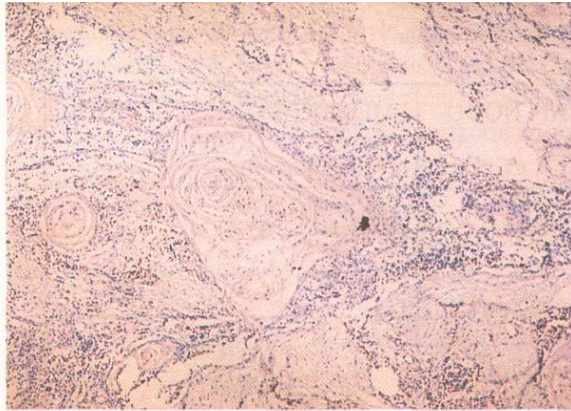
Tablo 2: CD-31 için ayırt edici değer 27.3 ve palpasyonla nodal durumun bölgesel lenf nodu metastaz durumuna göre dağılımı.



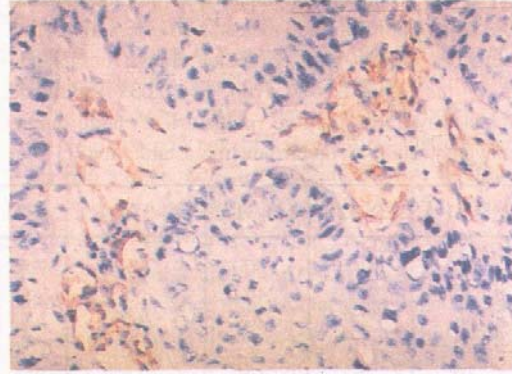
Resim 1: Larenksin squamöz hücreli karsinomu olgusunda immünohistokimyasal olarak p53 ekspresyonunun histopatolojik görünümü. (immünohistokimya x100)



Resim 2: Resim 1'deki olgunun daha büyük büyütmesi Tumor hücrelerinin nükleusları p53 proteini ile kahverengi boyanmıştır. (immünohistokimya x 200)



Resim 3: Bir larenks squamöz hücreli karsinoma olgusunda immünohistokimyasal olarak CD31 ekspresyonunun histopatolojik görünümü. (immünohistokimya x 100)



Resim 4: Resim 1'deki olgunun büyük büyütmedeki görünümü. Malign epitelyal adalar arasında mikrovasküler yapıların endotel hücreleri anti CD31 proteini ile kahverengi boyanmıştır. (immünohistokimya x 400)

TARTIŞMA VE SONUÇ :

P53 tümör süpresör geninin inaktivasyonu; kontrolsüz hücre gelişimi ile ilişkilidir. Bu da neoplazmlarda mutant p53 ün tanımlanmasını ve en sık kötü diferansiye anaplastik tümörlerde görülmesini açıklar (10). Bu temelde pek çok yazar mutant p53 geninin bağımsız prognostik faktör olduğu neoplastik hastalıklar tanımlamışlardır (2,3,17,18). Fonksiyonel olarak wild tip p53, normal hücre tiplerinde çok düşük konsantrasyonda bulunur ve yarı ömrü göreceli olarak kısadır. Normalde, wild tip p53 protein seviyesi standart immünohistokimyasal tekniklerle ölçülemez düzeydedir. P53 geninin mutasyonu sıklıkla gen ürününün aşırı ekspresyonuna yol açar, ki bunun feedback inhibisyonunun ortadan kalkması veya gen ürünü yarı ömrünün uzaması sayesinde olduğu düşünülmektedir (1). P53 gen mutasyonu larenks karsinogenezinde erken dönemde gelişir ve p53'ün immünohistokimyasal analizi, larenksin kanseröz ve prekanseröz lezyonları için tanısal sensitiviteyi artırır (13,7). Yine p53 ekspresyonu larenks kanserli hastalarda kemoterapi ve radyoterapiye artmış cevap ile ilişkilidir (1). Çalışmamızda CD-31 ekspresyonu ve p53 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi (spearman's rho, $p=0.877$). P53 ekspresyonu ile nodal metastaz (spearman's rho, $p=0.653$) ve histolojik derece (spearman's rho, $p=0.146$) arasında da anlamlı ilişki bulunmadı. Durum ve arkadaşları da benzer şekilde p53 ekspresyonu

ile klinikopatolojik parametreler arasında anlamlı ilişki bulmadıklarını rapor ettiler (4). Çalışmamızda p53 değerleri iki uçlu veriler halinde incelenmiştir. Daha hassas bir inceleme için p53'ün ayrıntılı kantitatif değerlendirilmesi gerekecektir. Literatürde bahsedilen prognostik ilişkiyi değerlendirmek için takip sürelerimiz henüz yeterli değildir.

Mikrodamar yoğunluğu ve metastaz riski arasında belirgin korelasyon olduğu bildirilen tümörler; non small cell akciğer (12), prostat (19), meme (8) ve baş-boyun (9) kanserleridir. Bunun gözlenmesi doğaldır, çünkü pek çok deneysel solid tümörde, tümör ve metastaz gelişiminin birden çok basamağında tümör anjiogenezisi etkindir. Anjiogenez yeni damarların oluştuğu bir işlemdir ve embriyonik gelişim, diferansiyasyon, proliferasyon ve yara iyileşmesi için gereklidir. Yine hayvan modellerinde tümör gelişimi, invazivliği ve progresyonunda anjiogenezin anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (5,6). Anjiogenez sadece tümör gelişimi için değil, metastaz için de gereklidir. Folkman'ın belirttiği gibi, "preneovaskülarizasyon fazında anjiogenezin yokluğu, tümör hücrelerinin proliferatif kapasitesinden bağımsız olarak tümör popülasyonunun yayılımını kısıtlar" (5). Baş-boyun tümörlerinde anjiogenez çalışmalarına ilgi artmaktadır. Petruzelli ve arkadaşları, civiv embriyosu koryoallantoik zarına greftlendiğinde baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarının anjiogenik cevabı indüklediklerini gösterdi (15).

Bu çalışmanın amacı CD-31 boyanmış endotel hücrelerinin miktarı ile yansıtılan anjiogenezin larenks skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda bölgesel lenf nodu metastazı gelişme riskini artırdığını göstermekti. CD-31 IgG süper ailesinden bir platelet endotelial adezyon molekülüdür. Endotelial hücrelere spesifik olarak bağlanan sensitif bir marker olduğu, lenfatik endotele ise bağlanmadığı gösterilmiştir. Bu adezyon molekülü endoCAM-1 (endothelial cell adhesion molecule) veya PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule) olarak da bilinmektedir. Vasküler endotelial hücrelerde yüksek miktarda ekspresyon edilir ve anjiogenez için faktör VIII-Ag'den daha sensitif bir marker olarak gözükmektedir. Faktör VIII-Ag bütün endotel hücrelerinde bulunmaz ve lenfatik endotelde de bulunur (11). Horak meme tümörlerini CD-31 ile boyadı; damar sayımı 99/mm²'den az olan 50 hastanın 2 tanesinde nodal tutulum gelişirken, damar sayımı 140/mm²'den yüksek olan grupta bu oran 39 hastada 31 nodal tutulumuna şı-

radı (11). Murray ve ark.'nın 51 olgudan oluşan larenks karsinomu serisinde anjiogenez oranı 20%'den az olan grubun 36%'sında nodal tutulum gerçekleşirken, bu oranın 20%'den yüksek olduğu grubun 77%'sinde nodal tutulum izlendi (14). Çalışmamızda anjiogenez göstergesi olarak kullandığımız CD-31 ekspresyonu ile nodal metastaz arasında anlamlı korelasyon bulundu (spearman's rho, p=0,009), fakat CD-31 düzeyi ayırıcı değildi. Bunun yanında CD-31 düzeyi, klinik olarak palpabl nod durumuyla beraber değerlendirildiğinde metastaz riski için ayırıcı değildi. CD-31 için ayırıcı değildi olduğu hesaplanan 27.3 (lojistik regresyon, p=0.0334)ün altındaki damar sayımına sahip ve palpabl lenf nodu bulunmayan hastaların hiçbirinde metastatik lenf nodu izlenmedi. Damar sayımı 27.3'ün üstünde olduğu ve palpabl lenf nodu bulunan hastaların 83.33%'ünde metastatik lenf nodu tespit edildi. 2 hastada (16.66%) damar sayımı 27.3'ün üzerinde olduğu ve palpabl lenf nodu bulunduğu halde metastatik lenf nodu saptanmadı (Tablo 2). Bu hasta grubunda primer tümörde neovaskülarizasyon açıkça izlenirken henüz metastazın izlenemediği teorik bir eşığe ulaşılmış olabilir. Aynı durum Murray ve arkadaşlarının 51 olguluk larenks karsinomu serisinde anjiogenez oranı 20%'den yüksek olduğu halde nodal tutulum izlenmeyen 6 olgusu ve yine Horak ve arkadaşlarının 103 olguluk meme kanseri serisinde yüksek damar sayımına rağmen nod tutulumu olmayan 8 olgusu için de geçerlidir (14,11).

Takip süresi henüz kısa olduğu için analiz edilememekle birlikte biri eksitus olan 3 nüks olgumuzun hiçbirinde palpabl nod yoktu ve CD-31 değerleri; 22.3, 52.3 (eks) ve 39.6 idi. Murray'in serisinde CD-31 oranı 20%'den fazla olup metastazı bulunmayan hasta grubunun 67%'sinde sonradan nüks ortaya çıkmıştır (14). No boyunlara yaklaşımı etkileyebilecek olan bu bilgiyi teyid etmek için daha geniş bir seriye ve daha uzun takip süresine ihtiyacımız var.

Bu çalışmada ortaya çıkan en net sonuç CD-31 değeri 27.3'ün altında olan ve boyunda palpabl nod bulunmayan larenks karsinomlu olgularda lenf nodu metastazı gelişmemesidir. Başka çalışmalar ve daha geniş serilerle desteklenmesi gerekmektedir, bu hasta grubunda selektif boyun diseksiyonuna alternatif tedavi ve takip yöntemlerinin dikkate alınması gerektiği kanaatindeyiz.

Yazışma Adresi: Dr. Sema Hücümenoğlu
Hoşdere C. No.164/3
Y. Ayrançı - ANKARA

KAYNAKLAR

1. BRADFORD CR, WOLF GT, CONEY TE: Predictive markers for response to chemotherapy, organ preservation, and survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999, 121:5,534-8
2. CHANG F, SYRJANEN S, SYRJANEN K.: Implications of the p53 tumorsuppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 1995, 13: 1009-22
3. CRAWFORD LV, PIM DC, LAMB P.: The cellular protein p53 in human tumours. *Mol Biol Med*, 1984, 2:261-72
4. DURSUN G, SAK SD, AKYOL G, DURSUN A, EREKUL S, DEMİRELLER A, AKINER M.: Over-expression of p53 in laryngeal carcinoma: Clinicopathological implications. *Ear Nose Throat J*, 1995, 74 (9): 645-8
5. FOLKMAN J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82: 4-6
6. FOLKMAN J, SHING Y.: Angiogenesis. *J Biol Chem*, 1992, 267: 10931-4
7. GALLO O, FRANCHI A., CHIARELLI I.: Potential biomarkers in predicting progression of epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol Suppl*, 527: 30-8
8. GASPARINI G, WEIDNER N, BERILACQUO P.: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 1994; 12:454-466.
9. GASPARINI G, WEIDNER N, MALUTA S.: Intratumoral microvessel density and p53 protein: Correlation with metastasis in head and neck carcinoma. *Int J Cancer*, 1993, 55:739-44
10. GOLUSINSKI W, OLOFSSON J, SZMEJA Z.A.: comprehensive analysis of selected diagnostic methods with respect to their usefulness in evaluating the biology of neoplastic cells in patients with laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1999, 256:6, 306-11
11. HORAKER, LEEKR, KLENKN.: Angiogenesis assessed by platelet / endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of nod metastases and survival in breast cancer. *Lancet*, 1992, 340: 1120-4
12. MACCHIARINI P., FONTANINI G, HARDIN MJ. : Relation of neovasculature to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 1992, 340: 145-6
13. MUNCK WIKLAND E, KUYLENSTIERNA R, LINDHOLM J, AUER G.: P53 immunostaining and image cytometry DNA analysis in precancerous and cancerous squamous epithelial lesions of the larynx. *Head Neck*, 1997,19:2, 107-15
14. MURRAY JOHN D., CARLSON GRANT W., MCLAUGHLIN K.: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Am J Surg* 1997; 174: 523-6
15. PETRUZZELLI GJ, SNYDERMAN CH, JOHNSON JT, MYERS EN.: Angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma xenografts in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1993, 102: 215-21
16. PULKKINEN JO, KLEMI P, MARTIKAINEN P.: Apoptosis in situ, p53, bcl-2 and AgNOR counts as prognostic factors in laryngeal cancer. *Anticancer Res*, 1999, 19: 1B, 703-7
17. SOMERS KD, SCHECHTER GL.: Genetic alterations in head and neck cancer. *Mol Biol Genet*, 1992, 25: 1065-71
18. SOUSSI T: The p53 tumor-suppressor gene: a model for nuclear epidemiology of human cancer. *Mol Med Today*, 1996,2:524-37
19. WEIDNER N., CARROL PR, FLAX J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 1993, 143: 1-9