

EPİTELYAL OVER TÜMÖRLERİNİN CD 34 VE VONWILLEBRAND FAKTÖR İLE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE DEĞERLENDİRİLMESİ*

S. İnan¹, T. Özgüder², H.S. Vatansever¹, K. Özbilgin¹, M. Sancı², S. Sayhan³

ÖZET

Amaç: Endotel hücrelerinin CD34 ve vonWillebrand Faktör (Faktör VIII) gibi özel işaretleyiciler ile immunohistokimyasal yöntemle boyanarak mikro damar sayılması, tümör anjiyogenezini belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, jinekolojik kanserler içinde 3. sıklıkla görülen ve en öldürücü olan epitelyal over tümörlerinin, normal over dokusu ile anjiyogenez açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal-Metod: Çalışmada SSK Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim Hastanesinde opere edilen ve patoloji laboratuvarında tanı konulan toplam 60 vaka değerlendirildi. Olgulardan folliküler ve luteal evredeki normal over dokuları kontrol grubu; borderline-seröz, borderline-müsinöz, seröz adenokarsinoma ve müsinöz adenokarsinoma tanı olgular ise çalışma grubu olarak belirlendi (n=10). Hastalardan elde edilen biopsiler formalin ile tespit edilerek rutin parafin takip protokolü uygulandı. Kesitler histolojik değerlendirme için hematoksil-eosin ile, anjiyogenezi belirlemek için endotel işaretleyiciler CD34 ve vonWillebrand Faktör primer antikorları ile indirek immunoperoksidaz tekniği kullanılarak değerlendirildi. Damar yüzey dansiteleri ölçümü için, çalışma ve kontrol gruplarında mikro damar sayımları intersept gridi kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak ANOVA testi ile değerlendirildi.

Bulgular: Folliküler ve luteal evrede alınan normal over dokularında damar yüzey dansite ölçümleri arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi. Borderline ve adenokarsinom olgularında istatistiksel olarak kontrol grubuna göre artış saptandı. Buna ilaveten, damar yüzey dansitesinin müsinöz kanserlerde en fazla olduğu görüldü.

Sonuç: Anjiyogenez, normal siklusda over ile endometriumda gözlenen folliküler-luteal evre değişikliklerinde ve kadın üreme sistemi hastalıklarının birçoğunda etiyopatogenezde ön plandadır. Bu çalışmada da malign over tümörlerinde damar yüzey dansitesinin istatistiksel olarak arttığı ve bu artışın müsinöz over karsinomlarında daha belirgin olduğu görülmüştür. Anjiyogenezin yoğun olduğu olgularda tedaviye anti-anjiyogenik kemoterapinin eklenmesinin yararlı olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal over tümörü, anjiyogenez, immunohistokimya

SUMMARY

Purpose: The staining of endothelial cells with specific markers such as CD34 and Factor VIII-Related Factor (vonWillebrand Factor) is a method used to detect angiogenesis of tumour. In this study, we aimed to evaluate the 3rd common type of gynecological cancer and fatal epithelial ovarian tumours, by using immunohistochemistry to investigate vascular surface density.

Materials and methods: In this study, sixty patients who were operated at the SSK Aegean Maternity Hospital were evaluated.

* Bu çalışma, VI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde sözlü sunu olarak sunulmuştur, P54, İstanbul, 2002.

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, MANİSA,

² SSK Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, İZMİR,

³ SSK Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Hastanesi, Patoloji AD, İZMİR,

Ovarian specimens from women in follicular or luteal phases without ovarian pathology were investigated as a control group; specimens with borderline serous, borderline mucinous, serous adenocarcinoma and mucinous adenocarcinoma, who had gone undergone laparoscopy were investigated as the study group (n= 10). Ovarian tissues were fixed in formaline and embedded in paraffin. Histological sections were immunostained with CD34 and vonWillebrand factor primary antibodies using indirect immunoperoxidase technique. Vascular surface densities in both study and control groups were evaluated with using intercept grid. Data were evaluated statistically with using ANOVA test.

Results: The mean vascular surface density was not statistically different between the ovarium in follicular and in luteal phases. The mean vascular surface density was significantly higher in both borderline and malign ovarian carcinoma than control group. In addition, the mean vascular surface density was highest in the in mucinous carcinoma.

Conclusion: Angiogenesis plays a key role during follicular and luteal phases in normal menstrual cycle and etiopathogenesis of female reproductive system diseases. In this study, the vascular surface density was increased statistically in malign ovarian carcinoma, and it was higher in mucinous ovarian carcinoma. Our results suggested that anti-angiogenic chemotherapy might be added to the treatment of ovarian carcinoma with increased angiogenesis.

Key Words: Epithelial ovarian tumour, angiogenesis, immunohistochemistry

Giriş

Over tümörleri, kadın üreme sisteminde üçüncü sıklıkla gözlenmesine rağmen en öldürücü kanserler arasında yer almaktadır (1). Bu nedenle, over tümörlerinin etiopatogenezi ile ilgili çalışmalardan alınan sonuçlar, tümörün erken tanı ve tedavisinin yönlendirilmesinde önemli olmaktadır.

Over tümörlerinin, yüzey (çöломik) epiteli, germ hücreleri ve seks kordonu-stroma hücrelerinden köken alan farklı patolojik tipleri vardır (2,3). Yüzey epiteli kökenli tümörler, tüm primer over tümörlerinin % 65-70'ini,

malign tipleri ise tüm over tümörlerinin % 90'ını oluşturmaktadır (4,5). Kesin benign ve malign tümörler yanısıra bazı epitelyal tümörler bu iki uç arasında kalır ve borderline (sınırdaki malign) olarak adlandırılırlar. Bu tümörler stromal invazyon olmaksızın epitelyal anaplazi ile karakterizedirler (1-6).

Anjiyogenez; inflamasyon, yara iyileşmesi, immün reaksiyonlar ve neoplazi gibi nedenlerle daha önceden varolan damarsal yapılardan yeni damarların oluşması olayıdır (7). Burada gerekli maddeler ve immün reaksiyon mediyatörleri yeni oluşan damar ağı sayesinde ortama taşınır. Kadın üreme sistemi, vücutta herhangi bir yaralanma olmaksızın anjiyogenezin sıklık olarak oluştuğu ve anjiyogenez fizyopatolojisinin kolayca incelenebileceği yegane bölgedir (8). Anjiyogenez sırasında çeşitli büyüme faktörleri (vasküler endotelial büyüme faktörü, asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü, platelet kaynaklı büyüme faktörü) önemli rol oynamaktadır (8). Özellikle malign tümörlerde artmış anjiyogenez, prognoz ve metastaz riski ile ilişkili görünmektedir (7,8). Bu nedenle, over tümörlerinde anjiyogenezin ortaya konması prognozu etkileyebilir ve tedaviyi yönlendirebilir.

Anjiyogenez, endotel hücrelerinin immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak işaretlenmesi ile gösterilebilir (9-11). Bu amaç için en sık kullanılan endotel işaretleyiciler CD34 ve vonWillebrand faktör'dür. von Willebrand faktör sadece endotel hücrelerini boyarken, CD34 antikoru hematopoetik hücrelerin erken gelişim safhaları ve kapillerler için spesifiktir.

Çalışmamızda endotel işaretleyicilerden CD34 ve vonWillebrand faktör (faktör VIII) primer antikorları kullanılarak indirek immunoperoksidaz yöntemiyle, borderline ve adenokarsinoma tanısı almış over tümörlerinde anjiyogenezi mikrodamar sayımı yapılarak elde edilecek damar yüzey dansiteleri ile değerlendirmek ve patofizyolojik süreçte önemini saptayabilmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Çalışmada SSK Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları Eğitim Hastanesinde opere edilen toplam 60 vaka değerlendirildi. Malignitesi bulunmayan, folliküler ve luteal evrede histerektomi uygulanmış hastalardan alınan

over dokuları kontrol grubu; borderline seröz ve müsinöz ile seröz ve müsinöz adenokarsinoma (her bir gruptan, n=10) tanı

olgular da çalışma grubu olarak değerlendirildi. Olguların demografik özellikleri Tablo 1' de özetlenmiştir.

Tablo 1: Olguların demografik özellikleri..

| | n | Yaş (ort) | Parite |
|--------------------------------------|----|--------------|---------|
| Foliküler evre | 10 | 32.5 (28-37) | 2.2±0.6 |
| Luteal evre | 10 | 31.7 (26-39) | 3.1±0.4 |
| Borderline seröz tümör | 10 | 39.5 (34-43) | 2.7±1.1 |
| Borderline müsinöz tümör | 10 | 40.8 (37-45) | 3.4±1.2 |
| Malign seröz adenokarsinoma | 10 | 46.8 (38-59) | 2.5±0.6 |
| Malign müsinöz adenokarsinoma | 10 | 52.1 (45-61) | 2.4±1.0 |

Hastalardan alınan biopsiler % 10'luk formalin içinde 24 saat tespit edildi. Derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyonu takiben, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi uygulanan doku örnekleri parafine gömüldü. Bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki kesitler histolojik değerlendirme için, deparafinize ve rehidrate edilerek hematoksil-eosin (H-E) ile boyandı.

Aynı dokulardan yapılan ek kesitler immunohistokimyasal boyama için hazırlandı. Kesitler önce tripsinize edilip dako pen ile çevrelenerek, dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için % 3'lük hidrojen peroksidaz uygulandı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler endotel işaretleyiciler olarak anti-CD34 (monoklonal antikor ClassII, M7165, DAKO) ve anti-vonWillebrand Faktör (monoklonal antikor, M0616, DAKO) primer antikorları ile (1/50 dilüsyonlarında) 18 saat + 4° C'de nemli ortamda inkübe edildi. Sekonder kit olarak avitin-biotin-peroxidase sistemi (Dako) kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoruna ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB (diaminobenzidine) uygulanan kesitler, hematoksil ile artalan boyaması yapılarak kapatma mediumu ile kapatıldı. İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve primer antikor ile aynı olan IgG, primer antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirildi.

Olympus BX40 marka ışık mikroskobu altında (X10) büyütmede incelenen CD34 ve vonWillebrand faktör ile boyalı kesitlerin mikroskopik görüntüleri JVC renkli video kamera (TK-C 601) aracılığıyla bilgisayar ekranına aktarıldı. 14 inç bilgisayar ekranına uyacak şekilde tasarlanan intersept gridi yardımıyla mikrodamar sayımları yapıldı (12). Damar yüzey dansitesini (VSD: Vascular Surface Density) hesaplamak için tüm alana isabet eden noktalar ile paraboller ile kesişen pozitif boyanma gösteren damarlar sayılarak aşağıda belirtilen formül uygulandı.

$$VSD = \frac{2 \times \Sigma I}{L/p \times \Sigma P}$$

Σ I : Toplam parabol ile kesişme gösteren pozitif boyanma gösteren damar sayısı

L/p: Parabol uzunluğu/büyütme (0,53)

Σ P : Toplam dokuya isabet eden + sayısı

Her kesitte farklı beş farklı alan seçilerek VSD saptandı ve bulunan değerlerin ortalaması hesaplamalarda kullanıldı. Kalın muskuler duvarı bulunan ve 8 adet eritrosit büyüklüğünden büyük lümeneye sahip damarlar sayılmadı. Benign dokulardaki ana damarlar pozitif kontrol olarak uygulandı. Fuji marka 100 ASA renkli fotoğraf filmi kullanılarak elde edildi. Elde edilen veriler ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

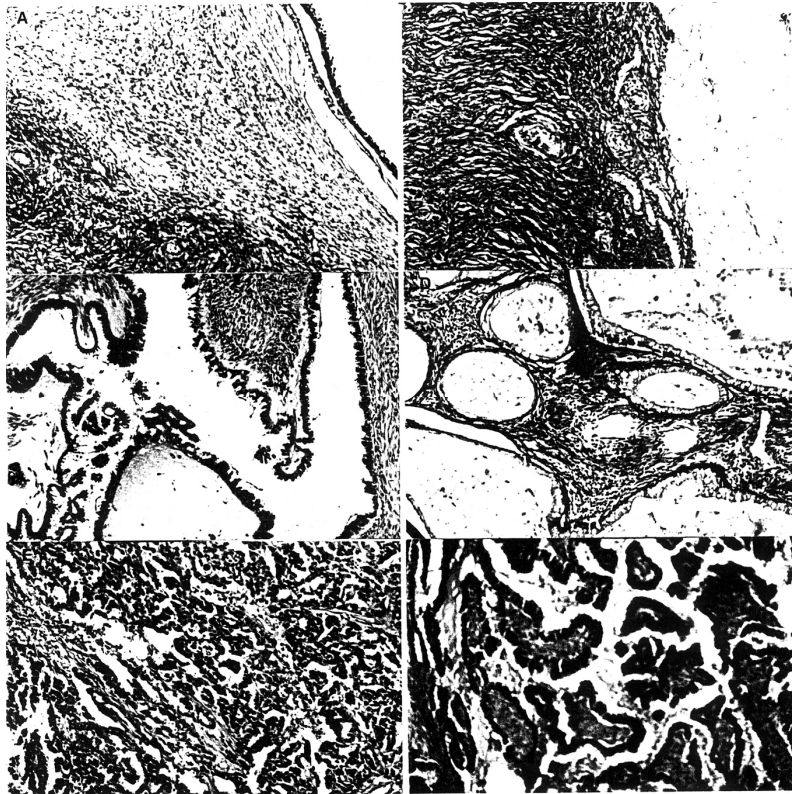
Bu çalışmada, toplam 60 vaka folliküler ve luteal evrede normal over dokusu,

borderline seröz ve müsinöz over tümörü ve malign seröz ve müsinöz adenokarsinoma olmak üzere 6 grupta incelendi.

Tüm gruplara ait H-E boyalı kesitlerden elde edilen histopatolojik görüntüler Resim 1' de gösterilmiştir. Kontrol grubu içinde yer alan folliküler evrede over dokusunun incelenmesinde, tek sıralı kübik epitel ile döşeli kapsül ve birkaç sıra follikül epiteli ile çevrili folliküllerin evre ile uyumlu olduğu görüldü (Resim 1-A). Luteal evrede alınan over dokusunda korpus luteum izlendi (Resim 1-B). Stromal invazyon olmaksızın epitelyal anaplazi ile karakterize borderline tümörlerin seröz tipinde bir kısmı silli, bir kısmı lümene kabarık sekretuar hücreler içeren tek sıralı yüksek silindirik epitel ile döşeli kistik yapılar görüldü (Resim 1-C). Borderline tümörlerin müsinöz tipinde ise yüksek silindirik epitel hücrelerin apikal yüzlerinde vakuollerin varlığı ve sillerin yer almadığı görüldü (Resim 1-D). Seröz adenokarsinom vakalarında döşeyici

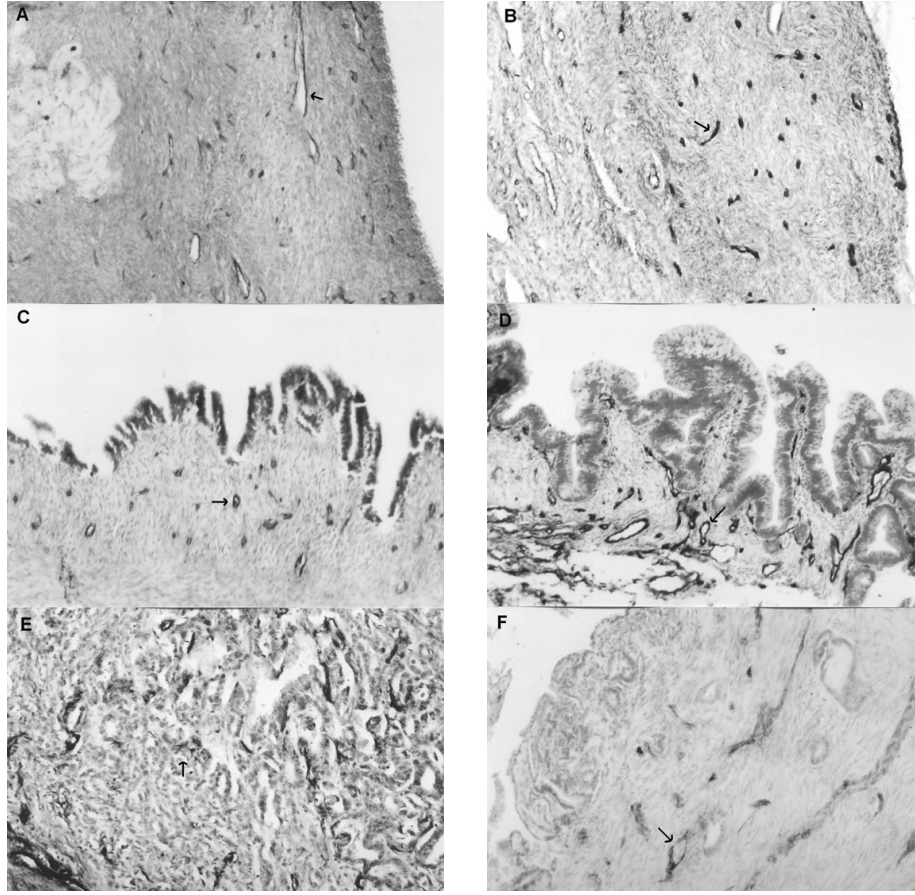
hücrelerin anaplazisi ve stromal invazyon açık olarak gözlemlendi (Resim 1-E). Müsinöz adenokarsinom vakalarında ise epitelin mukus salgılayan hücrelerden oluştuğu, kist içeriğinin müsinöz karakterde olduğu ve stromal invazyonun bulunduğu saptandı (Resim 1-F).

H-E boyama ile tanısı konan preparatlar endotel işaretleyiciler olan anti- CD34 ve anti-vonWillebrand faktör primer antikoru ile boyandı. Kesitlerdeki anjiyogenezi saptamada objektiviteyi arttırmak amacıyla kesit görüntüleri üzerine uygulanan intersept gridi aracılığı ile mikrodamar sayımı yapılarak VSD hesaplandı. Elde edilen ortalama sonuçlar Tablo 2' de belirtilmiştir. Endotel işaretleyiciler ile yapılan immunohistokimyasal boyamalardan, benzer boyamayı gösterdiği için sadece CD34 primer antikoru ile yapılan örnekler Resim 2' de gösterilmiştir.



Resim 1: Kontrol ve çalışma gruplarının, endotel işaretleyicilerinden CD 34 primer antikoru ile indirek immunohistokimya tekniği kullanılarak elde edilen mikrografları. Artalan Boyama: Mayer's hematoksilen, Kromojen: DAB,

(A): Folliküler evrede alınan normal over dokusu, (B): Luteal evrede alınan normal over dokusu, (C): Seröz borderline tümör, (D): Müsinöz borderline tümör, (E): Malign seröz adenokarsinoma, (F): Malign müsinöz adenokarsinoma. X 100. → : pozitif immunoreaktivite



Resim2: Kontrol ve çalışma gruplarına ait mikrograflar.

(A): Folliküler evrede alınan normal over dokusu, (B): Luteal evrede alınan normal over dokusu, (C): Seröz borderline tümör, (D): Müsinöz borderline tümör, (E): Malign seröz adenokarsinoma, (F): Malign müsinöz adenokarsinoma. H-E, X 100.

Tablo. 2 : Vakaların damar yüzey dansiteleri. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

| | ORTALAMA DAMAR YÜZEY DANSİTELERİ | |
|-------------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| | CD34 | vonWillebrand Faktör |
| n= 10 Folliküler evre (FE) | 125,65 \pm 21,13 | 119,15 \pm 19,25 |
| n= 10 Luteal evre (LE) | 119,45 \pm 15,36 | 110,44 \pm 18,89 |
| n= 10 Borderline seröz tümör (BST) | 128,64 \pm 14,65 | 118,28 \pm 11,39 |
| n= 10 Borderline müsinöz tümör (BMT) | 145,32 \pm 29,65 | 138,74 \pm 21,19 |
| n= 10 Malign seröz adenokarsinoma (MSA) | 179,37 \pm 24,28** | 167,34 \pm 27,13** |
| n= 10 Malign müsinöz adenokarsinoma (MMA) | 276,04 \pm 46,36* | 245,72 \pm 35,32* |

MMA vs MSA, BMT, LE, FE * $p < 0.001$,
MSA vs BST, LE, FE ** $p < 0.05$,

Kontrol grubuna ait olan folliküler ve luteal evrede alınan over doku kesitleri değerlendirildiğinde, damar yüzey dansitelerinin benzer olduğu ve istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü.

Borderline olgular değerlendirildiğinde, damar yüzey dansitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış olduğu saptandı. Seröz ve müsinöz adenokarsinoma olgularında, damar yüzey dansitelerinin borderline tümörlere göre artmış olduğu, bununla birlikte müsinöz adenokarsinoma tanıları kesitlerdeki damar yüzey dansitesinin, tüm diğer olgularla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi.

Tartışma

Değişik tümör tipleri ile yapılan birçok çalışmada, artmış anjiyogenez metastaz riskini arttıran prognostik bir faktör olarak görülmektedir (7-10). Solid tümörler, büyüme ve metastaz için mutlak yeni damarlanmaya ihtiyaç duyarlar. Bu yeniden damarlanma, hızlı büyüme, lokal invazyon ve metastatik yayılım için potansiyel risk faktörüdür. Bu yüzden tümöral büyüme her zaman neovaskülarizasyon yani anjiyogenez ile birlikte (11). Anjiyogenez gelişiminde ilk basamak kapiller damar bazal membranın ayrımlaşarak olayı başlatacak mediyatörlerin ve endotel hücrelerinin göçüne izin vermesidir (13,14). Yeni oluşan kapiller damarların bazal membranlarının, diğer kapiller damarlardan farklı olarak daha fragmente bir yapıda olduğu saptanmıştır (15).

Tümör anjiyogenezi ilk olarak cilt malign melanomlarında ortaya konmuştur (16). Daha sonra bir çok çalışmada meme karsinomu (17), mesane tümörü (18), prostat karsinomunda (19), büyük hücreli akciğer karsinomu (20), testiküler tümörler (21), serviks tümörlerinde (22) ve endometriyal karsinomalarda (23) anjiyogenez ve prognoz ilişkisi araştırılmıştır.

Hollingsworth ve ark. (11), ileri evre over karsinomlu olgularda CD34 kullanarak anjiyogenez ile prognoz arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve sonuçta prognozu belirlemede en önemli göstergenin evre olduğunu, fakat prognozu belirlemede en önemli belirtecin ise ortalama damar dansitesi olduğunu iddia etmişlerdir. Yine benzer şekilde Heimburg ve ark. (24), CD34 antikoru ile benzer vakalarda VSD oranı, histolojik tip, grade ve FIGO

evresi ile korelasyon saptayamamışlardır. Buna karşın, Obermaier ve ark. (25), ileri evredeki over tümörlerinde CD34 ile daha fazla VSD gösterdiği, fakat solid tümörlerin aksine epitelyal over tümörlerinde intratümöral damar yüzey dansitesinin prognoza etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Gasparini ve ark. (26), over tümörlerinde VSD ile klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla, over karsinomu tanısı almış 112 örneği CD31 antikoru ile değerlendirdiklerinde, intratümöral damar yoğunluğunun en fazla müsinöz karsinomda olduğu saptanmıştır.

Brustmann ve ark. (27), benign seröz kistadenomlar ve malign epitelyal over tümörlerinde anjiyogenezi vonWillebrand antikoru kullanarak araştırmışlar ve sonuçta malign lezyonlarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde damar yüzey dansitesinin fazla olduğunu saptamışlardır. Abulafia ve ark. ise (28), evre I invaziv over kanseri, borderline over kanseri ile karşılaştırıldığında damar yüzey dansitesini anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır.

Doku kesitlerinde damarlanmayı belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Schoell ve ark. (29) damar yoğunluğunu hesaplamada ilk kez bilgisayar kullanmışlardır. Çalışmamızda mm² başına damar yoğunluğu hesaplanarak kişisel farkların ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. X 100'lük büyütme alanındaki kesitsel görüntü, mikroskop kamerası yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılarak, intersept gridi ile damar yüzey dansiteleri hesaplanmıştır.

Çalışmamızda benign, borderline ve malign over tümörlerinde tümöral anjiyogenezi değerlendirmek üzere CD34 ve vonWillebrand faktör primer antikoru kullanılarak elde edilen sonuçlara göre, malign over tümörlerinde anjiyogenezin artmış olduğu ve malign müsinöz adenokarsinoma vakalarında daha belirgin olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak tümör anjiyogenezi özellikle invaziv karsinom tanısı için önemli olabilir. İnvaziv yada borderline tanısı arasında ayırım gücünü çekildiğinde tümöral anjiyogenez miktarı ayırıcı tanıya yardımcı olabilir. Özellikle anjiyogenik olarak fazla yoğunluktaki lezyonlara sahip olgularda anti-anjiyogenik kemoterapinin rolünün daha belirgin olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. DiSaia PJ, Creasman WT. Epithelial ovarian cancer. In: DiSaia PJ, Creasman WT, ed. *Clinical Oncology*. St. Louis: Mosby-Year Book. 1993: 333-425.
2. Scully RE. Common epithelial tumors of borderline malignancy (carcinoma of low potential): *Bull Cancer* 1982 ; 69; 228.
3. Russell P. Surface epithelial-stromal tumors of ovary. In: Kurman RJ, ed: *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. New York , 1994: 705.
4. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*: 8th ed. Mosby. StLouis Missouri, 1995.
5. Hart WR, Norris HJ. Borderline and malignant tumors of the ovary: *Cancer* 1973; 31: 1031.
6. Atasü T, Aydın K: *Jinekolojik Onkoloji*, Logos Yayıncılık, İstanbul, 1999: 312-440.
7. Gordon JD, Schiffren JL, Poulk RA, Taylor RN, Jaffe RB. Angiogenesis in the female reproductive tract: *Obstet Gynecol Surv* 1995; 50: 688-697.
8. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract: *Gynecol Oncol* 1999; 72: 220-231.
9. Alvarez AA, Krigman HR, Whitaker RS, Dodge RK, Rodriguez GC. The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma: *Clin Cancer Res* 1999; 5: 587-591.
10. Brown MR, Blanchette JO, Kohn EC. Angiogenesis in ovarian cancer: *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 901-918.
11. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma: *Am J Pathol* 1995; 147: 33-41.
12. Howard C.V, Reed M.G. *Unbiased Sterology: Three dimensional measurement in microscopy*. Bios Scientific Publishers, U.K. 1998: 116
13. Jaffe RB. Importance of angiogenesis in reproductive physiology: *Semin Perinatol* 2000; 24: 79-81.
14. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro: *Curr Biol* 1998; 8: 529-532.
15. Klagsbrun M, D'Amore D. Regulation of angiogenesis: *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-239.
16. Strivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4mm thick) skin melanoma: *Am J Pathol* 1988; 133: 413-423.
17. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma: *N Eng J Med* 1991; 324: 1-8.
18. Dickinson AJ, Fox SB, Persad AA, Hollyee J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder cancer: *Br J Urol* 1994; 74: 762-766.
19. Weldher N, Carroll PR, Flax J, Blimenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma: *Am J Pathol* 1993; 143: 401-409.
20. Macchiarini P, Fontani G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascular to metastasis of non-small cell lung cancer: *Lancet* 1992; 340: 145-146.
21. Olivarez D, Wilbrought T, DeRiese W, Foster R, Reister T, Einhorn L. Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor prediction of metastatic disease: *Cancer Res* 1994; 54: 2880-2882.
22. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabrewsi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma: *Gynecol Oncol* 1993; 56: 353-356.
23. Kirschner CV, Alanis-Amezcuca JM, Martin VG, Luna N, Morgan E, Yang JJ. Angiogenesis factor in endometrial carcinoma: a new prognostic indicator: *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1879-1884.

24. Heimburg S, Oehler MK, Papadopoulos T, Caffier H, Kristen P, Diel J. Prognostic relevance of the endothelial marker CD34 in ovarian cancer: *Anticancer Res* 1999; 19: 2527-2529.
25. Obermair A, Wasicky R, Kaider A, Preyer O, Losch A, Leodolter S, Kolbl H. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: *Cancer Lett* 1999; 138: 175-182.
26. Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, Verderio P, Boracchi P, Panizzoni GA, Radaelli U, Di Bacco A, Guglielmi RB, Bevilacqua P. Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas: *Int J Cancer* 1996; 69: 205-211.
27. Brustmann H, Riss P, Naude S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary: a quantitative histologic study: *Gynecol Oncol* 1997; 67: 20-26.
28. Abulafia O, Ruiz JE, Holcomb K, Dimaio TM, Lee YC, Sherer DM. Angiogenesis in early-invasive and low-malignant-potential epithelial ovarian carcinoma: *Obstet Gynecol* 2000; 95: 548-552.
29. Schoell WM, Pieber D, Reich O, Lahousen M, Janicek M, Guecer F, Winter R. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer* 1997; 80: 2257-2262.