

Ekspresi COX-2 dan VEGF pada Karsinoma Tiroid Papiler Metastase ke Kelenjar Getah Bening

Kurnia Arik Nugroho, Tulus Panuwun, Ety Hary K.

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
 Surabaya*

ABSTRAK

Latar belakang

Saat ini belum ada pemeriksaan untuk mengetahui penyebaran karsinoma tiroid papiler ke kelenjar getah bening selain dengan pemeriksaan histopatologi dari sediaan biopsi atau *radical neck dissection*, sehingga diperlukan mediator yang dapat dikembangkan untuk mendeteksi adanya metastasis. COX-2 memiliki peran dalam menghambat proses apoptosis, sedangkan VEGF berperan dalam proses angiogenesis. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis hubungan ekspresi COX-2 maupun VEGF pada karsinoma tiroid papiler dengan kejadian metastase pada kelenjar getah bening leher dan hubungan ekspresi COX-2 dan VEGF pada karsinoma tiroid papiler.

Metode

Penilaian dilakukan terhadap blok parafin penderita karsinoma tiroid papiler yang didiagnosis di RSUD Dr. Soetomo mulai Januari 2009-Juni 2013 dan memenuhi kriteria, untuk kepentingan statistik diambil 26 sampel. Kemudian dianalisis hubungan masing-masing variabel dengan uji koefisien kontingensi dan korelasi Spearman's.

Hasil

Ekspresi COX-2 dan VEGF negatif tidak didapatkan pada karsinoma tiroid papiler yang metastase ke kelenjar getah bening. Ekspresi COX-2 dan VEGF positif didapatkan pada karsinoma tiroid papiler yang metastase ke kelenjar getah bening dan tidak metastase. Uji hubungan ekspresi COX-2 maupun VEGF dengan kejadian metastase ke kelenjar getah bening menunjukkan tidak didapatkan hubungan, dan terdapat hubungan antara ekspresi COX-2 dan VEGF pada karsinoma tiroid papiler.

Kesimpulan

Ekspresi COX-2 dan VEGF tidak dapat digunakan untuk mendeteksi karsinoma tiroid papiler dengan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening. Ekspresi COX-2 dan VEGF dapat digunakan untuk deteksi karsinoma tiroid papiler.

Kata kunci: COX-2, karsinoma tiroid papiler, VEGF.

ABSTRACT

Background

At this era, only histopathology examination from biopsy specimen or radical neck dissection can be use to know about papillary thyroid carcinoma spreading. So, we need a mediator to detect metastatic possibility. COX-2 has a role in inhibition of apoptotic process, whereas VEGF is an angiogenesis. To investigate the coleration expression of COX-2 and also VEGF in papillary thyroid carcinoma and their relationship to cervical lymph metastases and to investigate the corelation expression COX-2 and VEGF in papillary thyroid carcinoma.

Methods

Assessment was performed on paraffin blocks of papillary thyroid carcinoma patients who were diagnosed in Dr. Soetomo Hospitals during January 2009-Juni 2013 and met the criteria and for statistical approach taken 26 samples, which each variable then analyzed with the cofficient contingency and Spearmans correlation.

Results

Not found negative expression of COX-2 and VEGF in papillary thyroid carcinoma with cervival lymph node metastase. Expression of COX-2 and VEGF was positif in all papillary thyroid carcinoma with cervival lymph node metastase and not. Testing the relationship between the expression of COX-2 and also VEGF with cervival lymph node metastase showed non significant correlation, and showed significant correlation between expression COX-2 and VEGF in papillary thyroid carcinoma.

Conclusion

COX-2 and VEGF expression could not be used to detected papillary thyroid carcinoma with to lymph node. COX-2 and VEGF expression could be used to detected papillary thyroid carcinoma.

Key words: COX-2, papillary thyroid carcinoma, VEGF.

PENDAHULUAN

Pada kelenjar endokrin, karsinoma tiroid merupakan keganasan tersering, yaitu 89% dari seluruh kanker endokrin. Penderita baru kanker tiroid mencapai 141.000 penderita, merupakan 1,3% dari seluruh penderita baru keganasan di dunia dan menduduki peringkat 20 jumlah penderita baru.^{1,2}

Karsinoma tiroid papiler (KTP) memiliki prognosis yang baik dengan angka ketahanan hidup dalam 10 tahun sebesar 93%, sedangkan karsinoma tiroid folikuler sebesar 85%.^{3,4} Penderita KTP sebesar 5-27% dapat menjadi agresif dan mengalami kekambuhan lokoregional, menyebabkan prognosis buruk bahkan kematian.⁴ Oleh karena itu maka faktor prognosis memegang peran penting untuk menentukan langkah terapi dan pemantauan lanjutan.^{5,6}

Saat ini, belum ada pemeriksaan untuk mengetahui penyebaran ke kelenjar getah bening selain dengan pemeriksaan histopatologi dari sediaan biopsi atau *radical neck dissection* (RND), yaitu tindakan untuk membuang kelenjar limfe leher dan jaringan sekitarnya dalam rangka penatalaksanaan kanker. Untuk itu peneliti berupaya untuk mendapatkan mediator yang kelak dapat dikembangkan untuk mendeteksi adanya metastasis karsinoma tiroid papiler (KTP) ke kelenjar getah bening (KGB) leher.³

COX-2 adalah enzim yang mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin yang berperan pada proses terjadinya kanker. Apoptosis yang berguna untuk menghambat proliferasi sel, juga dihambat oleh COX-2 sehingga proliferasi tak terkontrol.⁷ Angiogenesis adalah ciri penting keganasan dan berperan penting dalam invasi dan metastase.⁸ Ekspresi COX-2 yang tinggi didapatkan pada keganasan tiroid dan tidak didapatkan pada tiroid normal.⁹ Keganasan tiroid adalah tumor ganas yang banyak pembuluh darah (*hipervascular*). Penelitian menunjukkan bahwa *hipervascular* berhubungan langsung dengan prognosis yang buruk dibanding tumor dengan dengan vaskularisasi sedikit. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mempunyai peran penting pada angiogenesis pada tumor *microenvironment*. Beberapa penelitian menyebutkan ekspresi VEGF yang tinggi pada KTP dibanding normal tiroid. Ekspresi VEGF yang tinggi berhubungan langsung dengan besar tumor, metastase dan kekambuhan.¹⁰

Penelitian bertujuan menganalisis hubungan ekspresi COX-2 maupun VEGF dengan metastase ke kelenjar getah bening pada KTP sehingga akan bisa dijadikan mediator prediksi metastase dan hubungan ekspresi COX-2 dan VEGF pada KTP.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional* yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo dengan menggunakan blok parafin yang telah didiagnosis sebagai KTP di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya periode Januari 2009-Juni 2013. Sediaan didapatkan dari RND atau biopsi KGB, dengan hasil metastase atau tidak pada KGB. KTP yang tidak metastase ke KGB juga diperoleh sediaan tiroid dengan pemeriksaan klinis tidak didapatkan pembesaran KGB. Data lengkap penderita diperoleh dari rekam medik penderita yang tersimpan di Rekam Medik RSUD Dr. Soetomo.

Dipilih blok parafin yang mengandung yang memenuhi kriteria inklusi dan dilakukan pulasan imunohistokimia dengan menggunakan COX-2 *monoclonal mouse anti human* (Lab. Dako, Denmark). Dilakukan pula pulasan imunohistokimia dengan menggunakan VEGF *concentrate monoclonal antibody for human* (Lab. Biocare Medical, USA). Ekspresi protein COX-2 dan VEGF dinilai secara visual dengan mikroskop cahaya binokuler dengan melihat ekspresi pada sitoplasma, memakai skor dari Kawasaki *et al*,¹¹ merupakan penilaian, dinyatakan dengan gradasi semikuantitatif dari skor 0-3.

Tabel 1 penilaian intensitas dan persentase COX-2 dan VEGF pada sel tumor.

Nilai	Pewarnaan	Persentase
0	Negatif	0%
1	Weak	1-25%
2	Moderate	26-50%
3	Strong	51-75%
4	-	76-100%

Tabel 1 adalah penilaian ekspresi COX-2 dan VEGF pada sitoplasma sel tumor berdasarkan intensitas yang diberi nilai 1 sampai 3 dan berdasarkan persentase yang diberi nilai 1 sampai 4.

Tabel 2. Skor ekspresi COX 2 dan VEGF

Jumlah	Skor	SKOR
0	Negatif	-
2 - 3	Positif	+
3 < - 6	Positif	++
>6	Positif	+++

Tabel 2 menunjukkan skor akhir COX-2 dan VEGF yang didapatkan dengan penjumlahan intensitas dan persentase pewarnaan tumor yang tercatat positif (Tabel 1), kemudian dilihat nilainya (Tabel 2), hasil penjumlahan 0 diberi skor negatif, 2-3 skor +, 3-<6 skor ++ dan lebih dari 6 skor +++.

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan perangkat lunak *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Hubungan antara ekspresi COX-2 maupun VEGF dengan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening leher dan dianalisis dengan menggunakan uji koefisien kontingensi. Hubungan ekspresi COX-2 dan VEGF dianalisis dengan uji korelasi Spearman's. Kemaknaan pada penelitian ini ditetapkan pada $p < 0,05$.

HASIL

Dari pengumpulan data menurut laporan pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya selama periode Januari 2009 hingga Juni 2013 didapatkan sampel sebanyak 26, terdiri atas 15 sampel dengan KTP dengan metastase KGB, dan 11 sampel yang tidak metastase KGB.

Tabel 3. Karakteristik penderita karsinoma tiroid papiler.

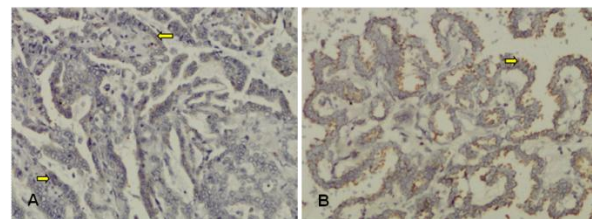
Usia	Metastase ke KGB	Tidak metastase ke KGB	Total
45-45 th	7 (46,7%)	8 (53,3%)	15 (57,7%)
55-64 th	4 (26,7%)	1 (6,7%)	5 (19,2%)
65-74 th	4 (26,7%)	2 (13,3%)	6 (23,1%)
	15		
Total	(100,0%)	11 (73,3%)	26 (100,0%)

Pada Tabel 3 tampak bahwa dari 15 sampel penelitian penderita KTP yang diambil dari rentang usia 45-74 tahun, dengan rerata (*mean*) 54 tahun dan terbanyak terjadi pada rentang usia 45-54 tahun. KTP secara keseluruhan terbanyak pada jenis kelamin wanita (58%), dengan perbandingan wanita : pria sebesar 1,8 : 1.

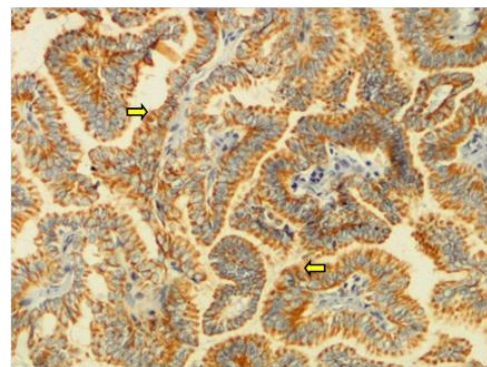
Tabel 4. Ekspresi COX-2 pada KTP

Skor	Metastase ke KGB	Tidak metastase ke KGB	Total
Negatif	0 (0,0%)	4 (36,4%)	4 (15,4%)
Positif (+)	1 (6,7%)	0 (0,0%)	1 (3,8%)
Positif (++)	4 (26,7%)	1 (9,1%)	5 (19,2%)
Positif (+++)	10 (66,7%)	6 (54,5%)	16 (61,5%)
Total	15 (100,0%)	11 (100,0%)	26 (100,0%)

Dari Tabel 4, COX-2 tidak terekspresi pada KTP yang bermetastase ke KGB, terekspresi baik pada KTP yang tidak bermetastase ke KGB.



Gambar 1. Ekspresi COX-2. A. Skor +, terpulas pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *weak*; B. Skor ++, terpulas pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *moderate* (pembesaran obyektif 20x).

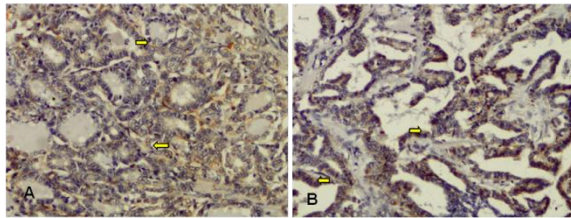


Gambar 2. Ekspresi COX-2 skor +++, tercatat pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *strong* (pembesaran obyektif 20x)

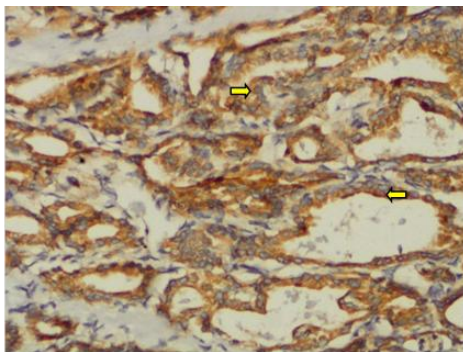
Tabel 5. Ekspresi VEGF pada KTP.

Skor	Metastase ke KGB	Tidak metastase ke KGB	Total
Negatif	0 (0,0%)	2 (18,2%)	2 (7,7%)
Positif (+)	1 (6,7%)	2 (18,2%)	3 (11,5%)
Positif (++)	8 (53,3%)	3 (27,3%)	11 (42,3%)
Positif (+++)	6 (40,0%)	4 (36,4%)	10 (38,5%)
Total	15 (100,0%)	11 (100,0%)	26 (100,0%)

Dari Tabel 5, VEGF tidak terekspresi pada KTP yang bermetastase ke KGB, terekspresi baik pada KTP yang tidak bermetastase ke KGB.



Gambar 3. Ekspresi VEGF. (A). Skor + terpulas pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *weak*, B. Skor ++, terpulas pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *moderate* (pembesaran obyektif 20x).



Gambar 4. Ekspresi VEGF skor +++, terpulas pada sitoplasma (tanda panah) dengan intensitas *strong* (pembesaran obyektif 20x).

Analisis statistic pada COX-2 dengan kejadian metastase ke KGB menggunakan koefisien kontingensi, dengan hasil 0,470, $p=0,06$. Analisis statistik pada COX-2 dengan kejadian metastase ke KGB menggunakan koefisien kontingensi, dengan hasil 0,384, $p=0,21$ ($p>0,05$), yang berarti hipotesis dari penelitian ini ditolak, yaitu tidak terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi COX-2 maupun VEGF pada KTP dengan kejadian metastase ke KGB. Hubungan COX-2 dan VEGF dengan kejadian metastase ke KGB dianalisis dengan korelasi Spearman's, didapatkan hasil 0,782, yang berarti hipotesis penelitian diterima, yaitu terdapat hubungan ekspresi COX-2 dan VEGF pada karsinoma tiroid papiler.

DISKUSI

Kasus KTP secara keseluruhan, terbanyak terjadi pada rentang usia 45 sampai 54 tahun. Hal ini sesuai dengan penelitiannya sebelumnya, kejadian KTP terbanyak pada usia 20-50 tahun.¹² Kejadian wanita dibanding pria sebesar 1,9 dibanding 1. Hal ini sesuai dengan keputa-

kaan, namun di kepustakaan dengan perbandingan yang lebih besar yaitu 4 dibanding 1.¹²

Penderita KTP yang bermetastase ke kelenjar getah bening, bahwa sebanyak lima belas sampel semua menunjukkan ekspresi COX-2 positif. Skor negatif, positif satu (+), dua(++) dan tiga (+++) didapatkan karsinoma tiroid papiler yang tidak metastase ke kelenjar getah bening.

Tidak didapatkan perubahan ekspresi COX-2 seiring dengan kejadian metastase ke kelenjar getah bening. Menurut kepustakaan pada kejadian metastase ke kelenjar getah bening didapatkan ekspresi yang tinggi, dan pada karsinoma tiroid papiler yang tidak metastase ke kelenjar getah bening leher ekspresinya lebih rendah.⁷ Pada penelitian terdahulu, didapatkan hubungan ekspresi COX-2 pada penderita KTP dengan lymph node metastase. Sebanyak 26 penderita didapatkan 21 yang terekspresi COX-2 (80,8%) dengan $p<0,005$.¹³ Didapatkan juga hubungan COX-2 dan kejadian metastase ke KGB dengan $p=0,009$ pada penelitian Ji B *et al*. Ekspresi COX-2 pada metastase ke KGB 83% dan yang tidak metastase ke KGB 49%.¹⁴

Ekspresi COX-2 yang tinggi ditemukan di berbagai keganasan, colon, payudara, dan tiroid.¹² Pada karsinoma tiroid papiler, ekspresi COX-2 meningkat seiring progresivitas tumor dan yang metastase ke kelenjar getah bening. Untuk dapat metastase ke kelenjar getah bening, matriks ekstra seluler harus diurai oleh enzim protease.⁷ Salah satu enzim protease adalah *matrix metalloproteinase* (MMP), yang apabila diaktifkan dapat menghancurkan berbagai komponen matriks ekstra seluler, khususnya kolagen interstisial (tipe I-III), membran basal (tipe IV) atau kolagen tipe V.¹⁵ Penelitian sebelumnya menemukan ekspresi MMP-2, MMP-9, TIMP-1 dan TIMP-2 pada 86 karsinoma tiroid papiler.¹⁴

Ekspresi COX-2 yang meningkat akan menginduksi ekspresi Bcl-2 yang anti apoptosis,⁷ sehingga sel ganas KTP makin progresif seperti pada KTP metastase ke KGB. Pada penelitian ini apabila peningkatan COX-2 tidak diiringi dengan progresivitas tumor seperti pada KTP yang tidak metastase ke KGB kemungkinan ada jalur lain yang menginduksi apoptosis, selain Bcl-2 sehingga tumor kurang progresif.¹⁶

Pada penelitian ini didapatkan bahwa pada karsinoma tiroid papiler yang metastase

tidak ada satupun sampel yang menunjukkan skor VEGF negatif, semua menunjukkan skor positif. Pada KTP yang tidak metastase ke KGB didapatkan hasil yang bervariasi negatif sampai positif. Tidak didapatkan adanya perubahan ekspresi VEGF pada KTP dengan metastase ke kelenjar getah bening leher dan yang tidak metastase ke kelenjar getah bening leher.

Pada penelitian sebelumnya, didapatkan ekspresi VEGF pada KTP metastase KGB 84,7% dan yang tidak metastase 73,2% dengan $p < 0,05$.¹⁷ Penelitian lain mendapatkan hubungan ekspresi VEGF dengan kejadian metastase KGB yaitu sebanyak 96% dan yang tidak metastase ke KGB 65% dengan $p = 0,02$,¹⁴ artinya didapatkan hubungan bermakna antara ekspresi VEGF dengan metastase KGB pada KTP.

KTP, seperti tumor ganas yang lain, semakin besar dan metastase maka ekspresi VEGF bertambah tinggi. Salah satu sifat dari kanker adalah kemampuan angiogenesis yang diperlukan untuk suplai makanan dan oksigen. Aktivitas angiogenesis mengakibatkan pertumbuhan tumor yang baik dan meningkatkan resiko metastasis.¹⁸

Sebaliknya, tumor yang tidak memiliki kemampuan angiogenesis kecil kemungkinan untuk berkembang menjadi tumor yang lebih besar, diameter tumor tidak dapat melebihi 1-2 mm. Hipoksia selalu terjadi dalam tumor yang berjarak $> 1-2$ mm dari pembuluh darah terdekat, karena sel-sel tumor lebih cepat berproliferasi dibanding sel-sel endotel yang direkrut untuk membentuk pembuluh darah yang pada umumnya tidak beraturan. Karena itu tumor berusaha untuk beradaptasi pada keadaan hipoksia kronik tersebut. Salah satu cara adalah menginduksi aktivitas faktor transkripsi HIF-1, yang terdiri atas HIF-1 α dan HIF-1 β . HIF-1 meningkatkan ekspresi gen yang menyandi enzim-enzim glikolitik dan gen VEGF.¹⁹ Neovaskularisasi meningkatkan populasi sel yang berproliferasi. Hal ini memperbesar kemungkinan meningkatkan potensi metastasis dengan diproduksinya enzim-enzim tertentu serta faktor-faktor pertumbuhan untuk dapat menembus organ sasaran dan kemudian hidup di dalamnya.²⁰ Ekspresi VEGF terdapat KTP papiler yang tidak metastasis, hal ini kemungkinan dikarenakan peningkatan VEGF yang terekspresi tidak sebanding dengan peningkatan MMP9.¹⁸

VEGF juga terekspresi pada karsinoma tiroid, selain itu juga berperan pada patogenesis dan angiogenesis pada karsinoma tiroid. Penelitian lain mengatakan bahwa COX-2 inhibitor menghambat proses angiogenesis dan ekspresi VEGF. Hal ini diduga ekspresi COX-2 yang kuat menginduksi ekspresi VEGF yang kuat pula, hal ini sesuai dengan penelitian ini yang didapatkan ekspresi COX-2 berhubungan dengan ekspresi VEGF pada karsinoma tiroid papiler.¹⁴

KESIMPULAN

Ekspresi COX-2 dan VEGF tidak dapat digunakan untuk deteksi karsinoma tiroid papiler dengan kejadian metastasis ke kelenjar getah bening. Ekspresi COX-2 dan VEGF dapat digunakan untuk deteksi karsinoma tiroid papiler.

DAFTAR PUSTAKA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
2. Norton JA. Neoplasma of the Endocrine System, *Surgical Oncology Contemporary Principle and Practice*. New York: Mc Graw-Hill; 2003.
3. Myers EN, Gastman BR. Neck Dissection: An operation in evolution. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 129: 14-25.
4. Rouxel A, Hejblum G, Bernier MO, Boëlle PY, Ménégaux F, Mansour G *et al*. Prognostic factor associated with the survival of patients developing loco-regional recurrences of differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 5362-8.
5. Ye C, Feng C, Wang S, Liu X, Li M. Antiangiogenic and anti tumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinol*. 2002; 143: 5322-8.
6. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical Review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1447-63.
7. Gosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Report*, 2010; 62: 233-44.
8. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. Review: The COX-2/PEGF₂ Pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour micro-environment. *Carcinogen*. 2009; 30: 377-86.

9. Sang KJ, Jae LH, Ji YS, Ji MO, Yeo KJ, Hyeong PK, *et al.* Immunohistochemical expression of COX-2 in thyroid nodules. *The Korean J Internal Med.* 2003; 18: 225-9.
10. Ho AL, Sherman E. Clinical development of kinase inhibitors for the treatment of differentiated thyroid cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011; 9: 32-41.
11. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by surviving predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 5071-4.
12. De Lellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathologi & Genetics Tumors of Endocrine Organs.* Lyon: IARC Press; 2004.
13. Miao A, Wan M, Cheng L. Expression of COX-2 and VEGF-C in papillary thyroid carcinoma and their relationship to cervical lymph metastases. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.* 2009; 23: 881-3.
14. Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G. COX2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population result of a single center study. *J Med Sci.* 2012; 9: 237-42.
15. Rydlova M, Holubec L, Ludvikova M, Kalfert D, Franekova J, Povysil C. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. *Anti Cancer Res.* 2008; 28: 1389-98.
16. Kresno SB. *Ilmu Dasar Onkologi.* Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2012.
17. Jiang HG, Gao M, Tang WP, Li FH, Cai QZ. Expression and significance of VEGF, VEGF-C and VEGF-D in papillary thyroid carcinoma. *Ai Zheng.* 2005; 24: 1136-9.
18. Ville RG. *Invasion in Cancer Metastasis. The Journey from the primary tumour to the circulation. The Journey from the primary tumour to the circulation.* New York: John Wiley dan Sons; 1995.
19. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alteration of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 68-72.
20. Khoka R, Voura E, Hill RP. *Tumor progression and metastasis; Cellular, molecular and microenvironmental factor. The Basic Science of Oncology 4thed.* New York: McGraw Hill; 2005.