

بررسی بیان نشانگر EGFR در اسکواموس سل کارسینومای دهان

دکتر جهانفرجهانبانی^۱، دکتر فاطمه شاهسواری^۲، دکتر کوثر بهادری^۳

۱- دانشیار بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دندانپزشکی تهران

۲- استادیار بخش پاتولوژی دهان، فک و صورت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دندانپزشکی تهران

۳- دندانپزشک

خلاصه:

سابقه و هدف: امروزه استفاده از نشانگرهای سلولی در تعیین خصوصیات بیولوژیک تومورها مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، تعیین فراوانی بروز نشانگر (گیرنده عامل رشد اپیدرمال)، EGFR در اسکواموس سل کارسینومای دهان و عوامل مرتبط با آن بود.

مواد و روش ها: مطالعه به روش توصیفی انجام شد. ۴۰ بلوک پارافینه مربوط به بیماران مبتلا به SCC دهان انتخاب شدند. ارزیابی بروز EGFR بر اساس شدت و وسعت درغشای سلولهای توموری در یک مقیاس ۰-۳ انجام گرفت: برای آنالیز داده ها، این تقسیم بندی در ۲ دسته بزرگتر به صورت زیرمجموعه گروه بندی شد: عدم بروز/بروز ضعیف (۰ یا ۱)، بروز متوسط/شدید (۲ یا ۳). یافته ها با آزمون دقیق فیشر بررسی گردید.

یافته ها: میزان بیان شدید نشانگر EGFR، ۴۵ درصد مشاهده گردید و آنهایی که بیماری با نشانگر بالا داشتند، در مواجهه بیشتری از جنس مونث بودند ($P < 0/02$). بروز EGFR با سن بیماران، درجه بندی و سایز تومور ارتباط معنی داری نداشت.

نتیجه گیری: به نظر می آید بروز EGFR در اسکواموس سل کارسینوم دهانی در جنس مونث افزایش یافته که میتواند رفتار بیولوژیک تومور را تحت تاثیر قرار دهد.

کلید واژه ها: کارسینوما، اسکواموس سل، سرطان، دهان، گیرنده رشد اپی درمال

وصول مقاله: ۹۱/۵/۲۱ اصلاح نهایی: ۹۱/۶/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۲۲

مقدمه:

گیرنده EGF (Epidermal Growth Factor) است، تولید شده و در حال حاضر مورد استفاده قرار می گیرد.^(۵)

نشانگر EGFR (گیرنده عامل رشد اپیدرمال)، برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ میلادی در رده سلولهای SCC گزارش شد.^(۶) بیان EGFR در اپیتلیوم سنگفرشی طبیعی، در بیماران بدون کانسر، ناچیز و قابل اغماض می باشد. درحالی که در بافتهای مبتلا به SCC سرگردن به طورنسبی افزایش می یابد.^(۷) بروز شدید EGFR بارها درکشت های سلولی و نمونه های تومورانسانی در اسکواموس سل کارسینوما مشاهده شده است.^(۶،۷)

تفاوت درروشهای رنگ امیزی ایمونوهیستوشیمیایی منجر به بروز تفاوت درمیزان رنگ پذیری مثبت EGFR می گردد.^(۷) با توجه به تلاشهای در حال انجام در زمینه گیرنده عامل رشد

اسکواموس سل کارسینوما (SCC) ششمین سرطان شایع در جهان می باشد.^(۱) این سرطان شایع ترین نئوپلاسم در حفره دهان است.^(۲) عوامل بسیاری در میزان پیشرفت بیماری دخالت دارند و روند بیماری را تسریع یا کند می کنند.^(۱) پیش بینی رفتار بیولوژیک این تومور در انتخاب طرح درمان مناسب نقش دارد. پیش بینی رفتارهای بیولوژیک SCC امروزه با کمک نشانگرهای تومور امکان پذیر شده است.^(۳) در دهه اخیر، یافته های زیادی در زمینه تغییرات مولکولی و ژنتیکی مسئول ایجاد سرطان و رفتار بیولوژیک سلولها، بدست آمده است. همچنین بعضی از آنها ممکن است هدف هایی برای مواد درمانی جدید باشند.^(۴) مثلاً عوامل درمانی متشکل از آنتی بادی های تک دودمانی ضد ErbB که یکی از اعضای خانواده

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر جهانفرجهانبانی، گروه آسیب شناسی فک و دهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دندانپزشکی تهران، پاسداران، گلستان ۵ پلاک ۱۷۷

تلفن: ۲۲۵۴۲۲۳۸ Email: jjahanbani@yahoo.com

۱ ساعت انکوبه شدند. سپس مقاطع با Pbs شستشو داده شده و با آنتی بادی های Pictinylated به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و به دنبال آن با Pbs شسته شد و با peroxidase labeled streptavidin به مدت ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه و مجدداً با Pbs شسته شد. آنگاه با کروموزن 3,3 (DAB) diaminobenzidine hydro chloride که منجر به بروز یک محصول واکنشی قهوه ای رنگ می شود، مجاور شدند. سپس مقاطع با ethyl - green رنگ آمیزی و مجدداً رطوبت گیری و در نهایت با لامل پوشیده شدند.^(۹) در هر دو آزمایش یک شاهد مثبت و یک شاهد منفی در کنار هر یک از مقاطع برده شد. شاهد مثبت لام مربوط به اپی تلوم سرویکس و شاهد منفی لام مربوط به عضلات اسکلتال بود.

ارزیابی بروز EGFR بر اساس شدت و وسعت EGFR immunolabelling درغشای سلولهای توموری که در یک مقیاس ۰-۳ طبقه بندی شده است انجام گرفت: ۰ (عدم بیان یا بیان در مقدار کمتر از ۱۰٪ سلولهای تومور)، ۱ (بیان ضعیف با طرح یکنواخت یا نا منظم در بیشتر از ۱۰٪ سلولهای تومور)، ۲ (بیان متوسط با طرح یکنواخت یا نا منظم در بیشتر از ۱۰٪ سلولهای تومور)، ۳ (بیان شدید با طرح یکنواخت یا نا منظم در بیشتر از ۱۰٪ سلولهای تومور). برای آنالیز داده ها، این تقسیم بندی در ۲ دسته بزرگتر به صورت زیر، گروه بندی گردید: عدم بیان/بیان ضعیف (۰ یا ۱) و بیان متوسط/شدید (۲ یا ۳).^(۹)

سپس یافته ها با استفاده از Fisher exact test جهت بررسی ارتباط EGFR و یافته های بالینی و هیستوپاتولوژیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت شمارش نقاط رنگ گرفته که با نمای قهوه ای کمی در هسته سلول دیده می شوند از نرم افزار Image focus capture ver. 2.5.2006 و از میکروسکوپ Euromex microscopeen Holland استفاده شد.

یافته ها:

این تحقیق روی ۴۰ بیمار واجد شرایط انجام گرفت. تعداد ۶۲/۵

اپیدرمال (EGFR) در درمان بدخیمی های انسانی، احتیاج به تعیین میزان بیان نشانگر EGFR در بیماران مبتلا به SCC دهان (OSCC) می باشد.^(۸) از آنجا که نقش بیان نشانگر EGFR در SCC دهان همچنان مورد سوال است و مطالعات بیشتر و دقیق تر برای تعیین نقش این نشانگر مورد نیاز می باشد، همین امر موجب گردید که این تحقیق با هدف تعیین میزان فراوانی نشانگر EGFR در SCC دهان در تعدادی از بیماران ایرانی انجام شود.

مواد و روش ها:

این مطالعه از نوع توصیفی و تعداد نمونه ها ۴۰ عدد بود. با بررسی پرونده بیماران، بلوکهای پارافینی متعلق به بیماران مبتلا به SCC دهان که تشخیص قطعی ضایعه برای آنها به روش میکروسکوپی داده شده بود، از بخش آسیب شناسی دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران انتخاب شدند. نمونه هایی که فاقد بافت کافی جهت ارزیابی میکروسکوپی بوده، یا واجد خونریزی یا نکروز فراوان بوده و یا اینکه اطلاعات موجود در پرونده بالینی بیمار ناکافی بود، از مطالعه خارج شدند. اطلاعات مربوط به بیماری (اندازه تومور، grade) و بیماران (سن، جنس) از پرونده بالینی و پاتولوژی آنها استخراج گردید.

برای بررسی میکروسکوپی، لامهای حاوی برشهای ۵ میکرونی SCC جهت رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین تهیه شده، سپس بلوکهای مربوط جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی برای نشانگر EGFR آماده شدند. به این ترتیب که این نمونه ها بر روی مقاطع ۳ میکرونی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال Antigen EGFR (ساخت کشور Dako کشور دانمارک) تهیه گردیدند. تمامی مقاطع در ابتدا پارافین زدایی و رطوبت گیری شد و در محلول تازه citrate HCL buffer 10MM با PH 6 به مدت ۱۰ دقیقه در مایکرو ویو قرار گرفتند. بعد از سرد شدن در دمای اتاق در PHOSPHATE BUFFERED SALIN (PBS) شسته و با آنتی بادی های anti EGFR Antigen با رقت ۱/۱۰ به مدت

آزمون کای دو نشان داد، این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.02$). هم چنین آنهایی که بیان نشانگر شدید داشتند ۶ برابر بیشتر از آنهایی که بیان ضعیف داشتند در جنس مونث دیده شدند. ($OR = 6$)

جدول ۲- توزیع فراوانی نمونه های OSCC بر حسب شدت بیان EGFR و به تفکیک عوامل مرتبط

عوامل مرتبط	EGFR expression		P-value
	عدم بروز / بروز ضعیف تعداد (درصد) تعداد = ۲۲	بروز متوسط / شدید تعداد (درصد) تعداد = ۱۸	
سن	۶۷ سال و بالاتر	۱۴ (۶۳/۶)	$p < 0.05$
	پایین تر از ۶۷ سال	۸ (۳۶/۴)	
جنس	مذکر	۱۲ (۵۴/۵)	$p < 0.02$
	مونث	۱۰ (۴۵/۵)	
Grade	Well	۱۸ (۸۱/۸)	$p < 0.06$
	Moderate-poor	۴ (۱۸/۲)	
سایز تومور	2 cm و بیشتر	۱۸ (۸۱/۸)	$p < 0.06$
	کمتر از 2 cm	۴ (۱۸/۲)	

بحث:

تحقیقات منتشر شده از میزان رنگ پذیری مثبت EGFR در اسکواموس سل کارسینومای سروگردن، در یک محدوده ۱۰۰-۵۵ درصد گزارش گردیده است.^(۱۰-۱۴) مطالعه ما بر روی نمونه های SCC دهان در ۴۰ بیمار که تشخیص قطعی SCC دهان برای آنها داده شده بود، میزان بروز شدید EGFR را در ۴۵ درصد از موارد نشان دادند.

برخی محققان، بیان EGFR را با Stage های پیشرفته تومور و وجود متاستاز به لنف نودها، متاستازهای دوردست، تمایز و تهاجم مرتبط دانسته اند.^(۱۵-۱۷) در حالی که برخی دیگر این رابطه را تایید نکرده اند.^(۱۸) Putti و همکاران بیان شدید EGFR در نمونه های با Stage های کلینیکی پیشرفته را در

درصد مونث و ۳۷/۵ درصد مذکر بودند و در محدوده سنی ۱/۳±۶۷/۸ سال قرار داشتند.

توزیع نمونه های مورد بررسی بر حسب شدت بیان نشانگر EGFR در جدول ۱ آمده است و نشان می دهد که بروز نشانگر EGFR در بیش از نیمی از نمونه ها (۵۵ درصد) خفیف و یا منفی بوده و در ۱۸ نمونه دیگر (۴۵ درصد) متوسط و شدید بود. ضمناً با توجه به شیوع ۵۴ درصد بروز متوسط و شدید نشانگر در نمونه های مورد بررسی، میزان واقعی آن با اطمینان ۹۵ درصد، حداقل ۳۰ تا ۶۰ درصد بر آورد گردید.

جدول ۱- توزیع فراوانی نمونه های مربوط به OSCC بر حسب

شدت بروز نشانگر EGFR

شدت بروز	فراوانی	
	تعداد	درصد
0	۱۲	۳۰
I ⁺	۱۰	۲۵
II ⁺	۱۵	۳۷/۵
III ⁺	۳	۷/۵
جمع	۴۰	۱۰۰

توزیع بیماران بر حسب محل اسکواموس سل کارسینوما نشان می دهد که شایعترین محل ضایعه در زبان و مخاط باکال هر کدام ۲۷/۵ درصد و لب و لثه هر کدام ۱۲/۵ درصد، در ریح آلئول ۱۰ درصد، در ماگزینا ۵ درصد و کمترین مربوط به کام و کف دهان بوده که هر کدام ۲/۵ درصد بوده اند.

توزیع بیماران مورد بررسی بر حسب شدت بیان نشانگر به تفکیک عوامل مرتبط در جدول ۲ آمده است و نشان می دهد نمونه هایی که نشانگر EGFR را به حالت متوسط و شدید نشان داده اند، در مواجهه بیشتری از نظر سن، grade و سایز تومور نبوده اند و یا اختلاف آنها به لحاظ آماری معنی دار نبود ($P < 0.05$). اما در نمونه هایی که بروز متوسط و شدید داشتند ۱۵ نفر یا ۳۸/۳ درصد مونث بودند و آنهایی که وضعیت بروز ضعیف نشانگر را داشتند ۱۰ نفر یا ۴۵/۵ درصد مونث بودند و

اسکواموس سل کارسینومای سروگردن نشان دادند.^(۱۹) در مطالعه Bergler و همکاران هیچ رابطه ای میان بیان EGFR و Stage تومور یافت نشد.^(۲۰)

متاسفانه در مطالعه ما امکان ارزیابی رابطه EGFR با Stage تومور وجود نداشت، زیرا اطلاعات مربوط به درگیری غدد لنفاوی و متاستاز به صورت دقیق ثبت نشده بود و این از محدودیت های تحقیق ما می باشد.

Putti و همکاران در تحقیقی نشان دادند که عامل رشد اپیدرمال و EGFR تنظیم رشد در تومورهای انسانی را تحت تاثیر قرار می دهند و با پروگنوز بیماری مرتبط می باشند.^(۱۹)

در مطالعه ما میان بیان EGFR و درجه تمایز (grading) رابطه معنی داری دیده نشد ($P=0/6$). در مطالعات Mariezkurrena, Hiraishi و نفرزاده و همکارانشان نیز رابطه معنی داری میان بیان شدید EGFR و درجه تمایز میکروسکوپی تومور مشاهده نگردید.^(۲۱-۲۳) Ulanovski و همکاران بیان EGFR را در ۳۴ درصد از SCC زبان گزارش کردند. آنها ارتباط معنی داری میان درجه تمایز و بیان EGFR مشاهده نمودند. درجه تمایز کمتر تومورها، بیان کمتر EGFR را نشان داد. به هر حال آنها رابطه ای میان بیان EGFR و ضخامت و stage که دوشاخص مهم پیشرفت تومور می باشند، پیدا نکردند.^(۲۴)

Storkel و همکاران نیز اهمیت پروگنوستیک بیان EGFR در ۱۰۰ بیمار مبتلا به OSCC را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه همه بیماران بروز EGFR را نشان دادند. به علاوه، بیان EGFR با درجه تمایز میکروسکوپی و با Survival ۵ ساله مرتبط بود.^(۲۵) این دو مطالعه از نظر وجود رابطه بین بروز EGFR و درجه تمایز میکروسکوپی تومور با مطالعه ما متفاوتند که می تواند ناشی از حجم نمونه بالا در مطالعات مورد نظر باشد.^(۲۴،۲۵) بنابراین اگرچه تعدادی از مطالعات پیشین بیان کرده اند که میزان بروز شدید نشانگر EGFR، یک نشانگر مرتبط با پروگنوز ضعیف در اسکواموس سل کارسینومای سروگردن می باشد، اما همه مطالعات از این نظریه حمایت نمی کنند. این اختلافات ممکن است ناشی از تفاوت در روشهای

امتیازدهی مختلف، تفاوت در روشهای اندازه گیری بیان EGFR، حساسیت تکنیکی، آنتی بادی های اختصاصی مورد استفاده، زمان Fixation یافت، سائز تومورها، مدت زمان Follow up، آنالیزهای آماری، و یا تفاوت در محل تومور، stage، درمان باشد.^(۲۶) به هر حال به نظر می رسد برای شناسایی زود هنگام OSCC و برخورد با آن وجود نشانگرهایی که بتواند برای ما این کار را انجام دهد، یکی از راه حل ها است.^(۲۷)

نتایج مطالعات ما نشان داد که بین بروز EGFR با سن و اندازه تومور ارتباط معنی داری وجود ندارد که اغلب مطالعات نیز این امر را تایید می کنند.^(۹،۲۱)

در مطالعه حاضر میان بروز EGFR و جنس بیماران، ارتباط معنی داری مشاهده گردید ($P=0/02$). از مجموع ۱۵ نمونه مذکر، ۱۲ نمونه دارای بروز خفیف بودند. همچنین از مجموع ۲۵ نفر مونث، ۱۰ نفر (۴۰ درصد) دارای بروز خفیف و ۱۵ نفر (۶۰ درصد) دارای بروز شدید بودند. در مطالعه Putti و همکاران نیز بیان EGFR با جنس مرتبط بود و بروز شدید EGFR بیشتر در جنس مونث دیده شد ($P=0/03$) که با نتایج مطالعه ما همراستا می باشد.^(۱۹) به نظر می رسد که با توجه به ذکر نشدن این رابطه در برخی تحقیقات نیاز به مطالعات بیشتر در مورد رابطه میان بروز EGFR و جنس بیماران وجود دارد.

نتیجه گیری:

مقالات پیشین میزان بیان شدید نشانگر EGFR را در محدوده ۱۰۰-۵۵ درصد گزارش نموده اند. در مطالعه ما میزان بیان شدید نشانگر EGFR، ۴۵ درصد مشاهده گردید که نشان می دهد این میزان بیان در جامعه مورد بررسی نسبت به آمارهای بین المللی، کمتر می باشد. همچنین —بروز شدید EGFR بیشتر در جنس مونث دیده شد که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد.

References:

- 1- Neville BW, Damn DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia:WB Saunders Company; 2009. pp: 409.
- 2- NaglerR .oral cancer –molecular aberrations and tumor marker cellular aberration . Harefuah .2003 Apr;142(4):272-6,318,317
- 3- Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T, etal. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. Cancer. 1998 Dec;83(12):2447-55.
- 4- Ernest J,StoterR,Bloemena E. The importance of EGFR in Squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy.Int J RadiatoncolBiolPhys .2006Aug;65(5):1323-9
- 5- RobinsS, Cotron R.Pathologic basis of disease.7nd Ed. Philadelphia:WB Saunders Co.2005;Chap7:296
- 6- Cowley GP, Smith JA, Gusterson BA. Increased EGF receptors on human squamous carcinoma cell lines. Br J Cancer. 1986Feb; 53(5); 223–229.
- 7- Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 1996 Sep 15;78(6):1284-92.
- 8- Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Shukla SN, Shah PM, Shah NG. Identification of site-specific prognostic biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. Neoplasma. 2011;58(3):217-26.
- 9- MonteiroL,S,Diniz-FreitasM,Garcia-Caballero T,FortezaJ,Fraga M.EGFR and ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology. J Oral Pathol Med. 2010 Aug 1;39(7):571-8.
- 10- van Oijen MG, Rijkssen G, ten Broek FW, Slootweg PJ. Increased expression of epidermal growth factor receptor in normal epithelium adjacent to head and neck carcinomas independent of tobacco and alcohol abuse. Oral Dis. 1998 Mar;4(1):4-8.
- 11- Wen QH, Nishimura T, Miwa T, Nagayama I, Furukawa M. J Laryngol Otol. Expression of EGF, EGFR and PCNA in laryngeal lesions. 1995 Jul;109(7):630-6.
- 12- Lee CS, Redshaw A, Boag G. Epidermal growth factor immunoreactivity in human laryngeal squamous cell carcinoma. Pathology .1997 Aug;29(3):251-4.
- 13- Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. Pathology. 1991 Jul;23(3):189-94.
- 14- ZhengX,HuL,ChenF,Christensson B.Expression of ki67 antigen ,epidermal growth factor receptor and Epstein-Barr virus –encoded latent membrane protein(LMPI) in nasopharyngeal carcinoma.Eur J Cancer B Oral Oncol .1994 Sep;30(5):290-295
- 15- Kanematsu T, Yano S, Uehara H, Bando Y, Sone S. Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients. Oncol Res. 2003;13(5):289-98.
- 16- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, etal. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. Clin Cancer Res. 1999 Dec;5(12):4164-74.
- 17- Christensen ME. The EGF receptor system in head and neck carcinomas and normal tissues. Immunohistochemical and quantitative studies. Dan Med Bull. 1998 Apr;45(2):121-34.
- 18- Christensen ME, Engbaek F, Therkildsen MH, Bretlau P, Nexø E. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay used for quantitation of epidermal growth factor receptor protein in head and neck carcinomas: evaluation, interpretations and limitations. Br J Cancer. 1995 Dec;72(6):1487-93.

- 19- Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan AT, Lai GM, Tse G, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology*. 2002 Aug;41(2):144-51.
- 20- Bergler W, Bier H, Ganzer U. The expression of epidermal growth factor receptors in the oral mucosa of patients with oral cancer. *Arch Otorhinolaryngol*. 1989;246(3):121-5.
- 21- Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(2):87-91.
- 22- Altuna Mariezkurrena X, Algaba Guimerá J, Wang Rodríguez J, Weisman R, Ongkeko W. [Immunohistochemistry study of EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2005 Apr;56(4):143-6.
- 23- NafarzadehSH, MoshrefM, MashhadiAbasF, TaheriZ. Correlation between expression of EGFR and Laminin-5 with clinical stage and microscopic grade of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Dental school, shahidBeheshti University of Medical science*. 2009;43-47 [Persian]
- 24- Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpitzer T, Popovtzer A, Feinmesser R. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol*. 2004 May;40(5):532-7.
- 25- Störkel S, Reichert T, Reiffen KA, Wagner W. EGFR and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas--a valuable tool in estimating the patient's prognosis. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1993 Oct;29B(4):273-7.
- 26- Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2007 May;13(3):285-90.
- 27- Sadri D, Shahsavari F, Alavi S. Expression of Ki67 antigen in Oral and esophagus squamous cell carcinoma. *Journal of Research in Dental Sciences*. 2011; 8(1): 34-40 [Persian]