

آنژیوزنز در موکوپیدر موئید کارسینوماى غدد بزاقى و ارتباط آن با درجه بافت شناختى

دکتر شهرو اعتماد مقدم^۱ - دکتر مژگان علاء الدینی^۱ - دکتر بهاره مظفری^۲

۱- استادیار مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دندانپزشک

چکیده

زمینه و هدف: آنژیوزنز فرایند پایه‌ای در رشد و متاستاز تومور است و با میانگین تراکم عروق خونی کوچک ارزیابی می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تراکم عروق خونی کوچک در موکوپیدر موئید کارسینوماى غدد بزاقى و تعیین ارتباط آن با درجه بافت‌شناختى می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی درجه بافت‌شناختى سی نمونه موکوپیدر موئید کارسینوما تعیین گشته و توسط آنتی‌بادی مونوکلونال بر ضد CD34 رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی صورت پذیرفت. تراکم عروق خونی کوچک با شمارش رگها توسط میکروسکوپ نوری، در نواحی دارای بیشترین تجمع عروقی در 10 High power field ارزیابی شد. جهت آنالیز نتایج به دست آمده از روش آماری ANOVA یک‌طرفه و آزمون post hoc از نوع Scheffe استفاده گردید.

یافته‌ها: میانگین تراکم عروق خونی کوچک (MVD) در گروه‌های کم، متوسط و زیاد به ترتیب ۱۱/۱۲، ۱۳/۶۶ و ۲۳/۵۰ به دست آمد. ارتباط آماری معنی‌دار بین میانگین MVD و درجه‌بندی بافت‌شناختى موکوپیدر موئید کارسینوما مشاهده شد. ($p=0/001$) میانگین MVD در تومورهایی با درجه کم و متوسط به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه زیاد کمتر بود (به ترتیب $p=0/001$ و $p=0/016$). در حالی که مقایسه ضایعات با درجه کم و متوسط تفاوت معنی‌داری نشان نداد. ($p=0/725$)

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد آنژیوزنز نقش مهمی در پیشرفت موکوپیدر موئید کارسینوماى غدد بزاقى داشته باشد.

کلید واژه‌ها: آنژیوزنز - موکوپیدر موئید کارسینوما - CD34.

پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۲/۱

اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۱۲/۱۱

وصول مقاله: ۱۳۸۸/۹/۹

نویسنده مسئول: دکتر مژگان علاء الدینی، استادیار مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

e.mail:malaeddini@sina.tums.ac.ir

مقدمه

گذاشته‌اند. تحقیقات متعددی Expression نشانگرهای مولکولی و ارتباط آنها با عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی این نئوپلاسم را مورد ارزیابی قرار دادند که در تعدادی از آنها روش درجه‌بندی بافت‌شناختی مذکور استفاده شده و برخی به ارتباط آماری معنی‌داری در این زمینه دست یافتند. (۵-۶) از طرف دیگر در سالیان اخیر، بسیاری از محققان تمرکز خاصی بر روی تقابلات استروما و تومور معطوف داشته‌اند که به طور مشخص بر رشد و پیشرفت نئوپلاسم اثر گذار است. (۷-۹) تهاجم و متاستاز دو عامل مهم در تعیین رفتار بدخیمیها هستند که با واکنشهای استرومایی همچون آنژیوزنز، التهاب و دسموپلازی مرتبط می‌باشند. (۹)

موکوپیدر موئید کارسینوما حدود ۳۴٪ سرطانهای غدد بزاقی اصلی و فرعی را شامل می‌شود و یکی از شایعترین نئوپلاسم‌های بدخیم این نواحی است. (۱)، رفتار بیولوژیک این کارسینوم بسیار متغیر بوده (۲) و تعیین پیش‌آگهی آن ارتباط مستقیمی با درجه بافت‌شناختی (Grade) و مرحله بالینی (Stage) تومور دارد. (۳) جهت درجه‌بندی بافت‌شناختی این نئوپلاسم، تا کنون روشهای متعددی با توانمندیهای متفاوت در تکرارپذیری و تعیین پیش‌آگهی ارائه شده است. در این راستا سیستم پیشنهادی Goode و همکارانش (۲-۴) در AFIP، توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده و یکسری از مطالعات اخیر نیز بر تأیید آن صحه

لازم به ذکر است که کلیه اسلایدهای H&E موجود برای هر تومور (به طور متوسط ۳ لام برای هر نمونه) از بایگانی انستیتو سرطان جدا شده و تحت بازبینی قرار گرفت. پس از تأیید تشخیص، درجه بندی بافت شناختی نئوپلاسم‌ها بر اساس معیارهای طبقه بندی Goode و همکارانش (۲، ۴) توسط دو نفر پاتولوژیست به طور مجزا ارزیابی شد. اختلاف نظرهای احتمالی نیز با به کارگیری میکروسکوپ چند چشمی بررسی شده و در صورت عدم توافق، نمونه از مطالعه حذف می‌شد. نهایتاً تعداد سی عدد بلوک پارافینی بر اساس معیارهای فوق انتخاب گردید، از بلوک‌های مذکور برش دومی تهیه و با استفاده از نشانگر CD34 رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی صورت پذیرفت.

ایمونوهیستوشیمی با روش LSAB انجام گرفت. از بلوک‌های پارافینی برشهای سه میکرونی تهیه گردید و تمام مقاطع در ابتدا با Xylene پارافین زدایی و با درجات مختلف الکترولیت‌گیری شدند. سپس جهت Block کردن پراکسیداز اندوژن، نمونه‌ها در ۳٪ هیدروژن پراکسید در فسفات بافر سالین تحت انکوباسیون قرار گرفتند. برای Antigen retrieval، بنا به توصیه کارخانه سازنده (DAKO) برشها در سیترات بافر گذاشته شد و دو مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه در مایکروفر قرار گرفتند. پس از سرد شدن در دمای اتاق تمام نمونه‌ها در Tris Buffer Sulfate شستشو داده شده و بعد با ۳٪ Bovine Serum Albumin برای جلوگیری از واکنش ایمنی غیر اختصاصی Block شدند. در این مرحله کلیه مقاطع شب تا صبح در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در آنتی‌بادی مونوکلونال موش بر ضد CD34 انسانی (QBEnd 10; Dako, Glostrup Denmark) در رقت ۱/۵۰ انکوبه شدند. پس از آن نمونه‌ها به ترتیب با آنتی‌بادی ثانویه بیوتینیل و Streptavidin، هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه مجاور گشتند، نهایتاً نمونه‌ها در ماده رنگزای Diamino Benzidine (DAB) قرار گرفته که منجر به بروز یک ماده قهوه‌ای رنگ شد. در آخر از محلول همتوکسیلین Mayer (به عنوان Counterstain) برای رنگ آمیزی استفاده شد. رنگ آمیزی فاقد آنتی‌بادی اولیه و مجاور سازی با mouse serum به عنوان کنترل منفی و یک نمونه شناخته شده بیوژنیک گرانولوما به عنوان کنترل مثبت به کار رفت. عروق خونی بزرگ با دیواره ضخیم و حاوی گلبول قرمز نیز به عنوان کنترل مثبت داخلی در نظر گرفته شدند. در آخر

آنژیوزنز، تولید عروق خونی جدید از عروق موجود بوده و یک پیش شرط مهم در رشد تومور و احتمال وقوع متاستاز می‌باشد. (۱۰)، این فرآیند پیچیده توسط عوامل مختلف "به نفع آنژیوزنز" و "ضد آنژیوزنز" کنترل می‌شود که از سلول‌های نئوپلاستیک، خونی، اندوتلیال، استرومایی و ماتریکس خارج سلولی منشاء گرفته و آزاد می‌شوند. (۱۱) ارزیابی بافت شناختی ریز عروق (Microvessel) انعکاسی از فعالیت آنژیوژنیک در بافتهای تومورال است. امروزه نشانگرهای اندوتلیالی برای سنجش تراکم عروق خونی کوچک مورد استفاده قرار می‌گیرند. CD34 یکی از این نشانگرهاست که بر اساس گزارشات، توانایی تعیین سلول‌های پیش‌ساز و نیز تمایز یافته اندوتلیالی را دارد. (۱۲)، ارزیابی تراکم عروق خونی کوچک در بدخیمیهای متعددی از جمله سرطان پستان، کارسینوم سنگفرشی دهان و کارسینوم‌های بزاقی صورت پذیرفته است. (۱۳-۱۵)، مطالعات در زمینه آنژیوزنز بر روی موکوپیدرومئید کارسینوماى بزاقی نیز انجام شده، (۱۵-۱۷)، اگرچه تعداد تحقیقات اندکی از منظر ارتباط آن با تمایز بافت شناختی این بدخیمی موجود است. هدف از این مطالعه تعیین میزان تراکم عروق خونی کوچک در غدد بزاقی اصلی و فرعی توسط آنتی‌بادی بر ضد CD34 و ارتباط آن با درجه بافت شناختی تومور است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی پرونده صد و چهل بیمار مبتلا به MEC از بایگانی انستیتو سرطان (بیمارستان امام خمینی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران) بین سالهای ۱۳۶۰-۱۳۸۴ استخراج گردید و بر اساس معیارهای ورود و خروج از مطالعه مورد بررسی مجدد قرار گرفت. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: تومورهای اولیه و فاقد متاستاز دور دست در هنگام تشخیص، بلوک‌های دارای بافت تومورال کافی، نئوپلاسم‌هایی که تحت جراحی کامل قرار گرفته و تأیید تشخیص میکروسکوپی و درجه بافت شناختی آنها توسط دو نفر پاتولوژیست صورت پذیرفته بود. معیارهای خروج از مطالعه نیز در برگیرنده دو مورد بود: نمونه‌های واقع در غده تحت فکی و آنهایی که دارای فیکساسیون نامناسب و مناطق وسیع خونریزی و نکروز بودند.

اختلاف آماری معنی‌داری از این نظر بین گروه‌های مورد نظر مشاهده شد. ($P=0/001$) در مقایسه دو گانه گروه‌های مذکور با استفاده از روش Scheffe، تراکم ریز عروق تومورهای رتبه بالا به طور معنی‌داری بیشتر از رتبه پایین و رتبه متوسط بود. (به ترتیب $P < 0/001$ و $P = 0/016$) هر چند اختلاف آماری معنی‌داری از نظر میانگین MVD بین درجات بافت‌شناختی کم و متوسط دیده نشد. ($P=0/725$)

بحث

آنژیوژنز یکی از مهمترین و شناخته شده‌ترین پاسخ‌هایی است که توسط تومورهای مختلف در میزبان القا می‌شود. (۱۹)، سلول‌های پستانداران برای ادامه بقا نیازمند اکسیژن و مواد غذایی بوده و بدین خاطر در فاصله $100-200 \mu m$ از عروق خونی قرار دارند؛ در واقع این فاصله حدی است که اکسیژن می‌تواند انتشار یابد.

برای رشد، ارگان‌سیم‌های چند سلولی ناگزیرند توسط واسکولوژن‌زیس و آنژیوژنز، عروق خونی جدید به وجود آورند. (۱۱)، تومورها نیز از این قاعده مستثنی نیستند و حتی با وجود اختلالات متعدد ژنتیکی که رشد و بقای آنها را تثبیت می‌کند، هیچ نئوپلاسمی نمی‌تواند از ۱-۲ میلی‌متر بزرگتر شود، مگر این که بتواند در داخل خود رگ ایجاد نماید. (۱۱)، برای بررسی کمی آنژیوژنز تومورها استفاده از روش‌هایی همانند تعیین تراکم ریز عروق یا MVD توصیه شده است. (۱۸)

در مطالعه حاضر میانگین MVD رابطه معنی‌داری با درجه تمایز بافت‌شناختی MEC نشان داد، به عبارت دیگر می‌توان عنوان کرد که میانگین MVD با افزایش رتبه مذکور در MEC افزایش می‌یابد، که توجه آن شاید به دلیل نیاز بیشتر تومورهای رتبه بالا به اکسیژن و مواد غذایی باشد. چنین ارتباطی در برخی سرطانهای دیگر نیز از قبیل کارسینوم داخل اپیتلیالی آنال، آدنوکارسینوم اندومتر، سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن نیز گزارش شده است. (۱۴، ۲۰-۲۱)

در بررسی اخیر همچنین میانگین MVD و درجه بافت‌شناختی در هر یک از سه رتبه با یک دیگر مقایسه شدند که گروه زیاد اختلاف معنی‌داری با کم و متوسط

سلول‌هایی که سیتوپلاسم آنها با رنگ‌آمیزی فوق به رنگ قهوه‌ای درآمد به عنوان رنگ پذیرفته تلقی شدند.

تعیین Microvessel density (MVD) بر اساس سیستم پیشنهاد شده توسط Weidner و همکارانش (۱۳) انجام شد. کلیه لام‌ها به وسیله دو نفر پاتولوژیست بدون اطلاع از درجه بافت‌شناختی بررسی شدند. بدین ترتیب که ابتدا نواحی "hot spot" در بزرگ‌نمایی $100\times$ مشخص شده سپس با درشت‌نمایی $400\times$ ریز عروق‌ها در سه زمینه میکروسکوپی شمارش شدند. بر اساس مطالعه Sharma و همکاران (۱۸)، تمام سلول‌های اندوتلیالی که رنگ قهوه‌ای گرفته بودند، چه به صورت تکی و چه به شکل تجمعی، در شرایطی که از ریزعروقهای مجاور به طور مجزا دیده می‌شدند (با یا بدون حضور لومن)، به عنوان یک ریزعروق تحت شمارش قرار می‌گرفتند. در رابطه با اندازه یک ریز عروق هیچ‌گونه محدودیتی وجود نداشت، ولی عروقی که دیواره ضخیم عضلانی داشتند یا حاوی تعداد زیادی گلبول قرمز بودند از شمارش حذف می‌شدند.

رابطه MVD با درجه بافت‌شناختی MEC توسط روش آماری ANOVA یک سویه مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه دوگانه درجه‌های مختلف نیز از تست post hoc با روش Scheffe استفاده شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر سی نمونه MEC غدد بزاقی ارزیابی گردید. درجه بافت‌شناختی ضایعات بر اساس تقسیم‌بندی Goode و همکارانش صورت گرفت، بدین گونه نمونه‌ها به سه گروه دسته‌بندی شدند که ۱۲ نمونه برابر ۴۰٪ در گروه کم، شش مورد معادل ۲۰٪ در گروه متوسط و ۱۲ تومور برابر ۴۰٪ در گروه زیاد قرار گرفتند.

بیشترین و کمترین میانگین MVD مربوط به گروه‌های کم، متوسط و زیاد در جدول ۱ آورده شده، که بدین ترتیب کمترین و بیشترین میانگین MVD با مقادیر $6/11$ و $44/50$ در گروه‌های کم و زیاد مشاهده شد.

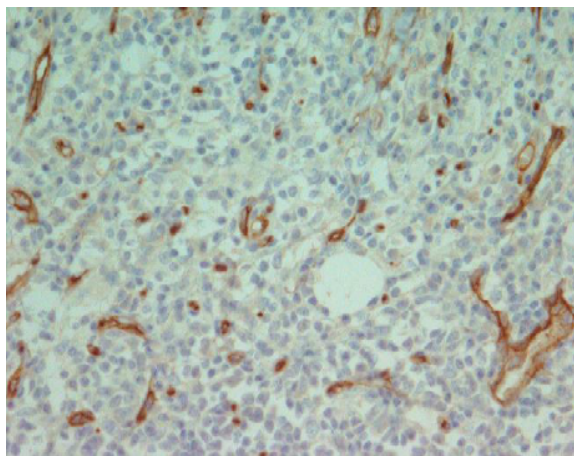
میانگین MVD در گروه‌های کم، متوسط و زیاد نیز به ترتیب $11/12$ ، $13/66$ و $23/50$ به دست آمد. (شکل ۱-۳) جهت مقایسه میانگین MVD در سه گروه بافت‌شناختی MEC از تست ANOVA یک سویه استفاده گردید که

جدول ۱: مقایسه درجات بافت‌شناختی موکوپیدرموئید کارسینوما بر اساس تراکم ریز عروق

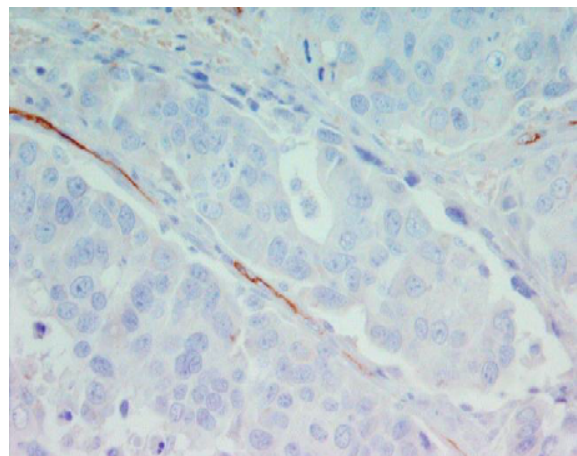
#P .V	تراکم ریز عروق در هر (Mean ± SD) * HPF	حداکثر میانگین تراکم ریز عروق	حداقل میانگین تراکم ریز عروق	تعداد	درجه بافت‌شناختی موکوپیدرموئید کارسینوما
	۱۱/۱۲ ± ۳/۸۷	۲۱/۲۰	۶/۱۰	۱۲	کم
<۰/۰۰۱	۱۳/۶۶ ± ۶/۶۲	۲۷/۰۰	۹/۶۰	۶	متوسط
	۲۳/۵۰ ± ۷/۹۰	۴۴/۵۰	۱۶/۲۰	۱۲	زیاد

* High power filed

One-way analysis of variance



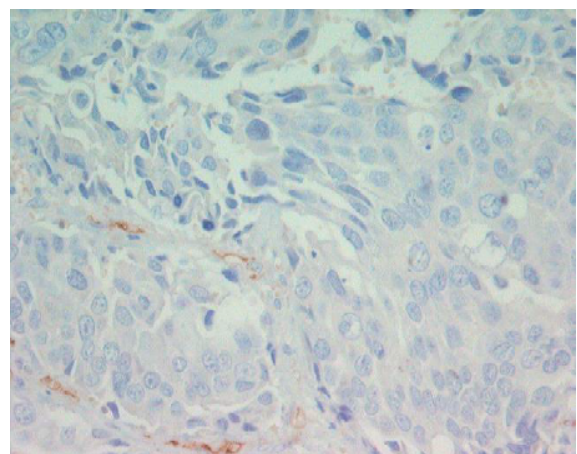
شکل ۳: رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی درجه زیاد موکوپیدرموئید کارسینوما با نشانگر CD34 (۴۰۰ ×)



شکل ۱: رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی درجه کم موکوپیدرموئید کارسینوما با نشانگر CD34 (۴۰۰ ×)

نشان داد. اما در مقایسه گروه متوسط با کم این اختلاف معنی‌دار نبود. این عدم اختلاف ممکن است ناشی از تعداد کم بیماران در این زیر گروه باشد و با بالا رفتن حجم نمونه، نتیجه به گونه دیگری رقم بخورد.

با مروری بر منابع موجود در دسترس، مطالعات محدودی به زبان انگلیسی در رابطه با ارزیابی رابطه آنژیوژنز و تمایز بافت‌شناختی موکوپیدرموئید کارسینوما یافت شد و از بین آنها دو مقاله جهت درجه‌بندی بافت‌شناختی این تومور از معیارهای Huvos و Paulino استفاده کرده بودند. (۱۶-۱۷)، لازم به ذکر است که نتایج این دو مطالعه با بررسی حاضر تفاوت داشتند به نحوی که در یکی، اختلاف



شکل ۲: رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی درجه متوسط موکوپیدرموئید کارسینوما با نشانگر CD34 (۴۰۰ ×)

سلول‌های درون تومور در مرحله‌ای تغییر کرده و فنوتیپ آنژیوژنیک پیدا می‌کنند. این تغییر تحت عنوان کلید خوردن آنژیوژنیک شناخته شده است. (۲۵)، با روشن شدن کلید آنژیوژن، توازن بین عوامل ضد و پیش برنده رگ‌سازی به نفع ایجاد آنژیوژن بهم می‌خورد. (۱۱)، بنابر تعریف درجه بافت‌شناختی نئوپلاسم، هر چه تمایز سلول‌های تومورال کمتر باشد درجه مذکور بالاتر است. (۲۶)، شاید بتوان اظهار کر که یکی از دلایل افزایش آنژیوژن در درجه بالای MEC بدین خاطر است که با کاهش تمایز سلول‌ها، احتمال افزایش موتاسیون‌های ژنتیکی در داخل آنها بیشتر می‌گردد و در نهایت به نحوی عمل می‌کند که مولکول‌ها و گیرنده‌های ضد آنژیوژن را غیر فعال و پیش برنده آن را فعال کرده و همان‌طور که انتظار می‌رود باعث ایجاد آنژیوژن می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نقش شناخته شده درجه بافت‌شناختی در تعیین پیش‌آگهی MEC، همچنین ارتباط مشاهده شده بین میانگین MVD و درجات بافت‌شناختی این نئوپلاسم در مطالعه حاضر، شاید بتوان آنژیوژن را به عنوان یک عامل پروگنوستیک مطرح کرد و از درمان‌های ضد آنژیوژن در بالین استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بودجه این مطالعه از محل طرح‌های تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (دانشکده دندانپزشکی) با شماره ۲۸/۲۰/۱۱۹ در تاریخ ۸۵/۱/۲۴ تأمین شده است، لذا مراتب تشکر و قدردانی خویش را از مسئولان محترم ذی‌ربط اعلام می‌نماید.

آماري معنی‌داری بین میزان MVD در درجه‌بندی کم با متوسط و زیاد مشاهده شد. (۱۷)، در مطالعه دیگر نیز اختلاف آماری معنی‌داری بین درجه‌بندی بافت‌شناختی و میانگین MVD دیده نشد. (۱۶)، از طرف دیگر در تحقیق Shi و همکاران نیز عوامل آنژیوژنیک در MEC مورد ارزیابی قرار گرفت که از سیستم درجه‌بندی بافت‌شناختی WHO سال ۱۹۹۱ استفاده گردید. (۲۲)، این مطلب حائز اهمیت است که در سیستم مذکور، MEC به دو گروه کم و زیاد تقسیم می‌شود. اگرچه در این مطالعه ارتباط آماری معنی‌داری بین دو گروه مشاهده شد (۲۲) اما نتایج آن با سیستم‌های ارائه‌گر سه گروه بافت‌شناختی به راحتی قابل مقایسه نمی‌باشد. Yang و همکاران نیز در مطالعه‌ای با به کارگیری CD105، آنژیوژن را در MEC بررسی کردند. (۲۳)، علی‌رغم مشاهده اختلاف آماری بین میانگین MVD در درجات مختلف بافت‌شناختی تومور در مطالعه مذکور، سیستم درجه‌بندی نئوپلاسم در آن مشخص نشده بود. (۲۳)، بدین ترتیب گرچه نتایج مطالعه مورد نظر با مطالعه حاضر به نظر هماهنگ می‌رسد ولی با توجه به کمبود اطلاعات در زمینه روش درجه‌بندی، این مقایسه دقیق نخواهد بود. در واقع در هیچ یک از چهار مطالعه فوق از سیستم درجه‌بندی Goode و همکاران استفاده نشده بود. در حالی که در طبقه‌بندی اخیر سازمان جهانی بهداشت، سیستم مذکور در زمینه توصیف سه درجه بافت‌شناختی MEC کارا و تکرارپذیر شناخته شده است. (۲۴)

شواهد بالینی و آزمایشگاهی حاکی از آنست که غالب تومورهای انسانی در طی مراحل ابتدایی و اولیه رشد خود، آنژیوژن را القا نمی‌کنند و گاه در طی ماهها و سالها بدون ایجاد نخیره خونی، بقا می‌یابند. همچنین ذکر شده برخی از

REFERENCES

1. Nance MA, Seethala RR, Wang Y, Chiosea SI, Myers EN, Johnson JT, et al. Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Cancer* 2008 Oct 15; 113 (8):2082-9.
2. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer* 1992 Apr 15;69(8):2021-30.
3. Pires FR, de Almeida OP, de Araujo VC, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004 Feb;130(2):174-80.

4. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: Clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer* 1998 Apr;82(7):1217-24.
5. Alaeddini M, Khalili M, Tirgary F, Etemad-Moghadam S. Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and its relation to histological grade. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jun;105(6):758-62.
6. Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol.* 2001 Oct;14(10):1008-14.
7. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol.* 2005 Nov;41(10):1028-33.
8. Chimenos-Kustner E, Font-Costa I, Lopez-Lopez J. Oral cancer risk and molecular markers. *Oral Med Oral Pathol Cir Bucal.* 2004 Nov-Dec;9(5):381-4; 377-80.
9. Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002 Dec;70(9-10):486-97.
10. Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Kalofonos H, et al. Angiogenesis in cancer of unknown primary: Clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1. *BMC. Cancer* 2005 Mar 3;5:25.
11. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
12. Nagatsuka H, Hibi K, Gunduz M, Tsujigiwa H, Tamamura R, Sugahara T, et al. Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin and their relationship with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005 Feb;34(2):70-6.
13. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8.
14. Klijanienko J, el-Naggar AK, de Braud F, Rodriguez-Peralto JL, Rodriguez R, Itzhaki M, et al. Tumor vascularization, mitotic index, histopathologic grade, and DNA ploidy in the assessment of 114 head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* 1995 Apr 1;75(7):1649-56.
15. Costa AF, Demasi AP, Bonfitto VL, Bonfitto JF, Furuse C, Araujo VC, et al. Angiogenesis in salivary carcinomas with and without myoepithelial differentiation. *Virchows Arch.* 2008 Oct;453(4):359-67.
16. Chou K, Chang L, Su H, Lee S, Lee H, Lee J, et al. Immunohistochemical study of tumor angiogenesis in mucoepidermoid carcinoma. *J Med Sci.* 2005;25(6):285-90.
17. Shieh YS, Hung YJ, Hsieh CB, Chen JS, Chou KC, Liu SY. Tumor-associated macrophage correlated with angiogenesis and progression of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *Ann Surg Oncol.* 2009 Mar;16(3):751-60.
18. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: A conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005 May;46(5):481-9.
19. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):429-47.
20. Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol.* 1999 Feb;72(2):220-31.
21. Mullerat J, Wong Te Fong LF, Davies SE, Winslet MC, Perrett CW. Angiogenesis in anal warts, anal intraepithelial neoplasia and anal squamous cell carcinoma. *Colorectal Dis.* 2003 Jul;5(4):353-7.

22. Shi L, Chen XM, Wang L, Zhang L, Chen Z. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: Correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome. *Cancer* 2007 Apr 15; 109(8):1523-31.
23. Yang S, Wang XY, Guo LJ, Tang XF, Gao QH, Xuan M, et al. Correlation between the expression of thrombospondin-1 and neovascularization in mucoepidermoid carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Oct 5; 121 (19):1875-81.
24. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (eds). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
25. Kumar Abbas, Fausto Mitchell. Robbins Basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2007.
26. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & maxillofacial pathology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 2009.