

## بررسی مقایسه‌ای هیستومورفومتريک عروق خونی و آرایش آنها در کیست فولیکولار، ادنتوزنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما

صفورا سیفی\*#، فریده فیزی\*\*، ثریا خفري\*\*\*، مهرداد آرام\*\*\*\*

\* استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

\*\* استادیار گروه بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

\*\*\* استادیار گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

\*\*\*\* دندانپزشک

تاریخ ارائه مقاله: ۹۰/۱۱/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۱

### Histomorphometric Comparative Evaluation of Blood Vessels and Their Distribution Pattern in Follicular Cyst, Odontogenic Keratocyst and Ameloblastoma

Safoura Seifi\*#, Farideh Feizi\*\*, Sorayya Khafri\*\*\*, Mehrdad Aram\*\*\*\*

\* Assistant Professor, Dept of Oral & Maxillofacial Pathology, School of Dentistry, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*\* Assistant Professor, Dept of Histology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*\*\* Assistant Professor, Dept of Social Medicine, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

\*\*\*\* Dentist

Received: 30 January 2012; Accepted: 21 May 2012

**Introduction:** Ameloblastoma is a benign epithelial odontogenic tumor that exhibits a more aggressive behavior than odontogenic keratocyst and follicular cyst. The purpose of this study was to determine and evaluate histomorphometric characteristics and blood vessels pattern adjacent to and far from odontogenic epithelium on the clinical behavior of the above odontogenic lesions with immunohistochemistry and morphometry method.

**Materials & Methods:** In this descriptive-cross-sectional study, 45 paraffin blocks of mentioned lesions were selected and marked immunohistochemically with CD34. From three HPFs (High Power Fields) in each slide which had more density of blood vessels in adjacent to and far from odontogenic epithelium, photography was done by a camera joined to a microscope with 40 times magnification. Through the software Motic plus 2, the internal and external diameters, section surface and thickness were determined. Also the blood vessel pattern was determined in the mentioned lesions and was compared through ANOVA, *t*-test and Multiple Comparison Test.

**Results:** The external and internal diameters and sectional surface in the regions far from the odontogenic epithelium in ameloblastoma was greater than keratocyst ( $P < 0.001$ ) and dentigerous cysts ( $P = 0.001$ ) but there was no significant statistical differences seen in the thickness of blood vessels in the regions far from the odontogenic epithelium in three lesions ( $P = 0.05$ ). Significant statistical difference was not seen in external ( $P = 0.8$ ) and internal ( $P = 0.8$ ) diameters, sectional ( $P = 0.6$ ) surface and blood vessels thickness in the adjacent regions of odontogenic epithelium in these three lesions. The pattern of blood vessels in ameloblastoma was circumferential and in the keratocyst and follicular cyst, it was directional.

**Conclusion:** It seems that morphometric characteristics of blood vessels (internal and external diameters, sectional surface) in areas far from odontogenic epithelium and the type of blood vessels pattern affects clinical aggressive behavior of ameloblastoma more than keratocyst and follicular cyst.

**Key words:** Ameloblastoma, odontogenic keratocyst, follicular cyst, CD34, morphometry.

# Corresponding Author: sf\_seify@yahoo.com

J Mash Dent Sch 2012; 36(3): 191-202.

## چکیده

**مقدمه:** آملوبلاستوما، تومور خوش خیم اپی تلیالی با رفتار تهاجمی بالینی نسبت به ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست فولیکولار است. هدف مطالعه حاضر تعیین و ارزیابی ویژگی‌های هیستومورفومتری عروق خونی در نواحی مجاور و دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک و آرایش آن‌ها بر رفتار تهاجمی بالینی ضایعات فوق بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی، ۴۵ بلوک پارافینه از ضایعات ادنتوژنیک مذکور انتخاب شد و رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر CD34 انجام شد. از ۳ فیلد میکروسکوپی در هر اسلاید که دارای تراکم عروق خونی بیشتر بود، در نواحی مجاور و دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک توسط دوربین متصل به میکروسکوپ با بزرگنمایی  $\times 40$  برابر، عکسبرداری شد، سپس با نرم افزار Plus<sub>2</sub> Motic متصل به میکروسکوپ، قطر داخلی، خارجی، سطح مقطع و ضخامت دیواره عروق خونی تعیین گردید. همچنین آرایش عروق خونی در ضایعات مذکور تعیین و نتایج با آنالیز آماری ANOVA, t-test, Multiple Comparison Test تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** قطر خارجی، قطر داخلی، سطح مقطع عروق خونی در نواحی دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک به ترتیب در آملوبلاستوما بیشتر از کراتوسیست ( $P < 0.001$ ) و کیست فولیکولار ( $P = 0.001$ ) بود؛ اما در ضخامت دیواره عروق خونی در نواحی دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک در سه ضایعه فوق اختلاف آماری معنی داری دیده نشد ( $P = 0.05$ ). اختلاف آماری معنی داری در ارتباط با قطر خارجی ( $P = 0.08$ )، داخلی ( $P = 0.08$ )، سطح مقطع ( $P = 0.06$ ) و ضخامت دیواره عروق خونی ( $P = 0.04$ ) در نواحی مجاور اپی تلیوم ادنتوژنیک در سه ضایعه فوق مشاهده نشد. آرایش عروق خونی در آملوبلاستوما Circumferential و در کراتوسیست و کیست فولیکولار، Directional بود.

**نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد که ویژگی‌های مورفومتری عروق خونی (قطر داخلی، خارجی و سطح مقطع) در نواحی دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک و نوع آرایش عروق خونی بر رفتار تهاجمی بالینی آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست و کیست فولیکولار مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آملوبلاستوما، ادنتوژنیک کراتوسیست، کیست فولیکولار، CD34، مورفومتری.

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۳۹۱ دوره ۳۶ / شماره ۳: ۱۹۱-۲۰۲.

## مقدمه

درمان آن Marginal resection است.<sup>(۵)</sup>

هیستومورفومتری عبارت است از محاسبه و اندازه گیری بافت‌ها و اجزاء مختلف موجود در بافت و در حقیقت محاسبه کمی خواص سه بعدی بافت‌ها و اجزاء تشکیل دهنده آنها با استفاده از تصاویر دو بعدی و قوانین هندسی توسط عکسبرداری از اسلایدهای میکروسکوپی، که با دوربین متصل به کامپیوتر و نرم افزار مخصوص انجام می‌شود. مورفومتری روش حساس و دقیق، اختصاصی و قابل تکرار بوده و احتمال خطاهای ناشی از دید چشم انسانی کمتر است.<sup>(۶)</sup> تا به امروز مطالعات کمی دانسیته (تراکم) عروق خونی را در ضایعات ادنتوژنیک بررسی کرده‌اند.<sup>(۷)</sup>

همچنین در بررسی مقالات انگلیسی زبان تنها در مطالعه Godbil و همکاران، سطح مقطع بیشتر عروق خونی در کراتوسیست نسبت به کیست فولیکولار گزارش شده است. ایشان افزایش سطح مقطع و تعداد عروق خونی در

کیست دنتی ژروس (فولیکولار)، شایع‌ترین کیست تکاملی ادنتوژنیک است که در حدود ۲۰ درصد کل کیست‌های حقیقی فک را تشکیل می‌دهد. درمان آن از طریق Enucleation و گاهی خروج دندان درگیر بوده و پیش‌آگهی آن عالی و عود بسیار اندکی دارد.<sup>(۱)</sup> ادنتوژنیک کراتوسیست، کیست تکاملی نسبتاً شایع ادنتوژنیک بوده که در طبقه‌بندی جدید در رده ضایعات تومورال قرار گرفته و به عنوان تومور خوش خیم سیستیک در نظر گرفته شده است و دارای عود بالا و رفتار تهاجمی می‌باشد. درمان آن از طریق Enucleation و کورتاژ و مارتوسویالیزاسیون بوده و به دلیل ویژگی‌های موجود در اپی تلیوم و بافت همبندی عود بالایی دارد.<sup>(۲)</sup> در مجموع احتمال عود آن ۶۲-۵٪ گزارش شده است.<sup>(۳و۴)</sup> آملوبلاستوما، شایع‌ترین تومور خوش خیم اپی تلیالی ادنتوژنیک با رفتار تهاجمی بالینی بوده و بهترین روش

سال‌های ۷۳-۹۰ مورد بررسی قرار گرفت و پرونده بیماران با تشخیص ضایعات ادنتوژنیک شامل کیست فولیکولار، ادنتوژنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما خارج شد. اطلاعات بالینی شامل سن، جنس، محل ضایعه از پرونده بیماران استخراج شده و در جداولی ثبت گردید. سپس بلوک‌های پارافینه نمونه‌های مورد مطالعه خارج شد و جهت تایید تشخیص و ورود به مطالعه از آنها برش ۵ میکرون برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین زده شد. پس از مشاهده اسلایدهای هماتوکسیلین-ئوزین توسط پاتولوژیست دهان، اسلایدهایی که دارای بافت کافی بودند، انتخاب شدند. نمونه‌ها با خونریزی و آماس زیاد و بافت ناکافی و مرتبط با عود قبلی و بیوپسی اینسینال از مطالعه خارج شدند. در این مطالعه صرفاً بلوک‌های پارافینه ادنتوژنیک کراتوسیست پاراکراتینیزه و غیرمرتبط با سندرم گورلین-گولتز وارد شدند و انواع ارتوکراتینیزه ادنتوژنیک کراتوسیست از مطالعه خارج شدند.

بلوک‌های مناسب انتخاب شد و جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با نشانگر CD34 برش‌های ۴ میکرونی از آنها تهیه شد. در مجموع ۴۵ بلوک پارافینه انتخاب شده که شامل ۱۵ مورد کیست فولیکولار، ۱۵ نمونه ادنتوژنیک کراتوسیست و ۱۵ مورد آملوبلاستوما (۸ مورد فولیکولر و ۷ نمونه پلکسی فرم) بوده و خصوصیات میکروسکوپی تعریف شده در کتاب Nevill<sup>(۱)</sup> را داشتند.

برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برش‌های بلوک‌های پارافینه ۴ میکرونی ابتدا در گزین، پارافین‌زدایی شدند. سپس جهت آگیری در درجات مختلف الکل قرار گرفتند و بعد از آن برای توقف فعالیت پراکسیداز داخلی، در ۳٪ هیدروژن پراکساید با بافرسفات قرار گرفتند. فرایند بازیافت آنتی ژن در ماکروویو (پاناسونیک، ۱۳۸۰ وات) با فشار ۲ اتمسفر در ۱۲۰ درجه

کراتوسیست را مرتبط با عود و رفتار تهاجمی‌تر آن نسبت به کیست فولیکولار گزارش کردند.<sup>(۸)</sup> اما تا به حال در مطالعه‌ای قطر داخلی، خارجی، ضخامت و آرایش عروق خونی در ضایعات ادنتوژنیک بررسی نشده است. مطالعات قبلی ویژگی‌های هیستومورفومتری را در اپی‌تلیوم ضایعات دهانی بررسی کرده و کمتر بر روی اجزاء همبندی تحقیقی انجام داده اند.<sup>(۹)</sup>

در زمینه ارتباط قطر، سطح مقطع و ضخامت عروق خونی با رفتار بالینی ضایعات، نتایج ضد و نقیضی به چشم می‌خورد.<sup>(۱۰-۱۲)</sup> به طوری که Korkolopoulou و همکاران، سطح مقطع و شکل عروق خونی را موثر بر رفتار تهاجمی کارسینوم مثانه دانستند<sup>(۱۱)</sup>، Sharma و همکاران، افزایش سطح مقطع عروق خونی در کارسینوم پستان و پروستات را مرتبط با پیش‌آگهی ضعیف گزارش نمود، اما بیان کردند که در سرطان شش و مثانه ارتباطی با پیش‌آگهی مشاهده نشد. ایشان آرایش عروق خونی در ملانوما و کارسینوم سلول سنگفرشی را موثر بر پیش‌آگهی گزارش کردند.<sup>(۱۲)</sup> لذا هدف مطالعه حاضر بررسی اندازه (قطر داخلی، خارجی، سطح مقطع و ضخامت) در نواحی مجاور و دور از اپی‌تلیوم ادنتوژنیک و آرایش عروق خونی در کیست فولیکولار، ادنتوژنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما با رفتار تهاجمی بالینی متفاوت به روش ایمونوهیستوشیمی با نشانگر CD34 و مورفومتری می‌باشد و اینکه آیا ارتباطی بین اندازه (سطح مقطع، قطر، ضخامت) و آرایش عروق خونی با رفتار بالینی ضایعات وجود دارد یا خیر.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی کلیه فایل‌های آرشیو دانشکده دندانپزشکی بابل از سال‌های ۹۰-۸۲ و فایل‌های بیمارستان آموزشی-درمانی شهید بهشتی بابل مربوط به

آسیب‌های بافتی در مراحل اولیه تشکیل می‌شوند، دیواره عضلانی و ضخیم ندارند).

قطر داخلی، خارجی، سطح مقطع و ضخامت دیواره عروق خونی در کیست فولیکولار، ادنتوژنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما در دو ناحیه هیستوپاتولوژی شامل نواحی مجاور و دور از اپی‌تلیوم ادنتوژنیک بررسی شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ثبت گردید.

منظور از Hot spots منطقه‌ایست که دارای بیشترین تراکم عروق خونی بوده و در ناحیه مرکزی تومور یا کیست قرار داشته و در حد یک فیلد میکروسکوپی تقریباً  $2\text{mm}^2$  در زیر غشاء پایه باشد.

منظور از تعیین ویژگی‌های هیستومورفومتري در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوژنیک در آملوبلاستوما عبارتند از Hot spots که در محیط بافت تومور بوده و فاصله جزایر تومورال تا Invasive front حدوداً  $2\text{mm}^2$  باشد و در ادنتوژنیک کراتوسیست و کیست فولیکولار عبارتند از نواحی دارای بیشترین تراکم عروق خونی که حداکثر  $2\text{mm}^2$  از نواحی عمقی بافت همبندی یا نواحی نزدیک به ترابکول استخوانی فاصله داشته باشد.<sup>(۱۴)</sup>

جهت تعیین سطح مقطع عروق خونی بعد از انتقال تصاویر به Motic Image Plus 2 با کمک قلم مخصوص دور دیواره خارجی عروق خونی خطی ترسیم گردید و نرم‌افزار، سطح مقطع عروق خونی را ارائه می‌داد به طوری که در هر اسلاید در ۳ فیلد تعیین شده، اندازه سطح مقطع وارد Excel شده و میانگین آن به عنوان سطح مقطع کلی عروق خونی در هر ضایعه ادنتوژنیک به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شد.

قطر خارجی عبارتست از فاصله دورترین نقاط در دیواره رگ و قطر داخلی عبارتست از فاصله نزدیک‌ترین نقاط در دیواره رگ و متوسط قطر داخلی و خارجی هر

سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت و تحت تأثیر آنتی‌بادی اولیه با Anti CD34 (A/S, QBend 10, Glostrup, DAKO, Denmark) به مدت ۳۰ دقیقه و با رقت ۱/۱۰ در حرارت مربوط انکوبه شدند و بعد از آن تحت تأثیر آنتی‌بادی ثانویه (۱۵ دقیقه)، DAB (دی‌آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید) جهت واکنش رنگ‌پذیری، همتاکسیلین مایرز برای رنگ‌پذیری زمینه قرار گرفت. بافت کارسینوم سلول سنگفرشی به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. شاهد منفی حذف آنتی‌بادی اولیه و جایگزینی با بافرسفات بود. از ۴ مورد مخاط نرمال دهان اطراف هیپرکراتوزیس، به عنوان کنترل مثبت داخلی استفاده شد.

ارزیابی عروق خونی، طبق روش توصیف شده Weidner و همکاران انجام شد.<sup>(۱۳)</sup> در ابتدا اسلایدهای ایمونوهیستوشیمی کیست فولیکولار، ادنتوژنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما با بزرگنمایی ۱۰ برابر با میکروسکوپ نوری Olympus (BX41, Tokyo, Japan) مشاهده شدند و ۳ ناحیه که دارای بیشترین تعداد عروق خونی (Hot spots) بود، در نظر گرفته شد و از این ۳ فیلد با بزرگنمایی ۴۰ برابر توسط دوربین متصل به کامپیوتر تصویربرداری گردید و تصاویر به نرم‌افزار Motic Image plus2 (micro-optic industrial Group Co. LTD) متصل به میکروسکوپ نوری منتقل شد و قطر داخلی، قطر خارجی، سطح مقطع، ضخامت دیواره عروق تعیین شد و میانگین آن در سه فیلد میکروسکوپی در نظر گرفته شد.

لازم به ذکر است سلول‌های آندوتلیالی که با نشانگر CD34 به رنگ قهوه‌ای درآمده بودند و به صورت خوشه‌ای در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند و تشکیل لومن عروقی را داده بودند، در محاسبه تعداد عروق خونی منظور شدند. عروق خونی با دیواره عضلانی و ضخیم از مطالعه خارج شدند (عروق خونی که در مراحل ترمیم و

رگ با فرمول زیر محاسبه شد.<sup>(۱۵)</sup>

$$\text{بزرگنمایی} = \sqrt{I} \times b = \text{قطر متوسط رگ}$$

$$b = D2 - I = D1 \text{ (قطر خارجی)}$$

برای تعیین ضخامت عروق خونی از تفاضل میانگین قطر خارجی (D1) و میانگین قطر داخلی (D2) استفاده شد.  $D3 = D1 - D2$  ضخامت

در تعیین آرایش عروق خونی فقط عروق خونی مجاور با غشاء پایه در نظر گرفته شد. در صورتی که میانگین عروق خونی در امتداد غشاء پایه بودند و زاویه تقریباً صفر درجه با غشاء پایه داشتند، آرایش Circumferential در نظر گرفته شد و در مواقعی که عروق خونی عمود بر غشاء پایه یا دارای زاویه‌ای با غشاء پایه بودند، به عنوان آرایش Directoinal نامیده شد.<sup>(۱۶)</sup>

برای جهت مقایسه میانگین قطر داخلی، خارجی، ضخامت و سطح مقطع عروق خونی در سه گروه ضایعات ادنتوزنیک از آنالیز ANOVA و جهت مقایسه دو گروه از ضایعات ادنتوزنیک از آنالیز T test استفاده شد.  $P < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

اطلاعات بالینی نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده است.

نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و هیستومورفومتری عروق خونی (تصاویر ۱ و ۲ و ۳ و ۴) در نواحی دور و مجاور اپی‌تلیوم ادنتوزنیک اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد و بیشترین قطر خارجی عروق خونی در آملوبلاستوما و کمترین آن در کیست فولیکولار مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). قطر داخلی و سطح مقطع عروق خونی در ناحیه دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما بیشترین ( $P = 0/001$ ) و در کیست فولیکولار ( $P < 0/001$ ) کمترین بود.

اگرچه ضخامت دیواره عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما بیشتر از ادنتوزنیک کراتوسیست و کیست فولیکولار بود اما اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ( $P = 0/05$ ) (جدول ۲).

در مقایسه قطر خارجی عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست ( $P = 0/002$ ) و کیست فولیکولار ( $P < 0/001$ ) اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت در مقایسه قطر داخلی عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست ( $P < 0/001$ ) و کیست فولیکولار ( $P < 0/001$ ) اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد.

اگرچه قطر خارجی و قطر داخلی عروق خونی در مجاورت اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما بیشتر از کیست فولیکولار و ادنتوزنیک کراتوسیست بود اما اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت ( $P = 0/8$ ).

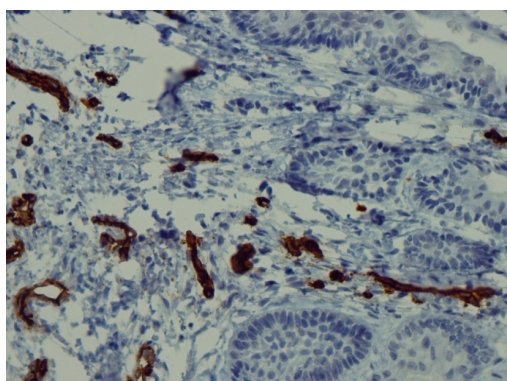
سطح مقطع و ضخامت عروق خونی در مجاورت اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در ادنتوزنیک کراتوسیست بیشتر از کیست فولیکولار ( $P = 0/4$ ) و آملوبلاستوما بود ( $P = 0/6$ ) اما اختلاف آماری معنی‌داری بین سه گروه مشاهده نشد (جدول ۳).

اختلاف آماری معنی‌دار در مورد میانگین کلی قطر خارجی ( $P = 0/02$ ) و داخلی ( $P = 0/001$ ) بین سه ضایعه ادنتوزنیک فوق مشاهده شد. اگرچه سطح مقطع کلی عروق خونی در آملوبلاستوما بیشتر از کراتوسیست و کیست فولیکولار بود اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P = 0/07$ ).

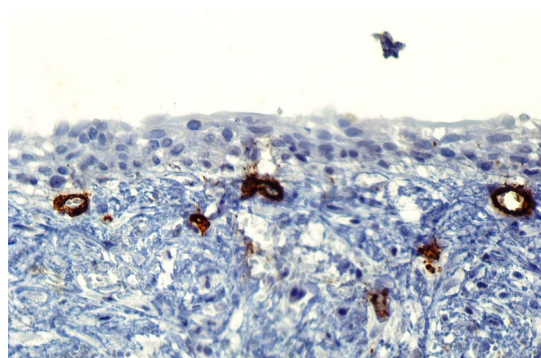
اختلاف آماری معنی‌دار در مورد میانگین ضخامت کلی عروق خونی در سه ضایعه ادنتوزنیک فوق مشاهده نشد ( $P = 0/4$ ) (جدول ۴).

آرایش عروق خونی در مجاورت غشاء پایه در آملوبلاستوما، آرایش Circumferential بود، به طوری که عروق خونی در محیط جزایر آملوبلاستومایی و در امتداد غشاء پایه مشاهده شدند. در کیست دنتی ژروس و تومور ادنتوژنیک کراتوسیست آرایش Directional نمایان بود و عروق خونی به صورت عمودی و یا زاویه دار با غشاء پایه رویت گردیدند.

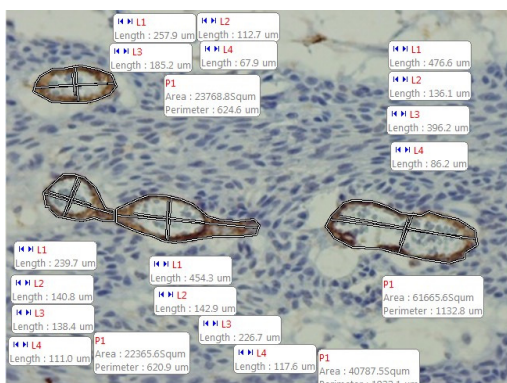
میانگین کلی قطر خارجی عروق خونی در آملوبلاستوما نسبت به کیست فولیکولار بیشتر بود اما از نظر آماری اختلاف معنی داری در میانگین کلی قطر خارجی عروق خونی در آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست مشاهده نگردید ( $P=0/13$ ) همچنین میانگین کلی قطر داخلی عروق خونی در آملوبلاستوما بیشتر از کراتوسیست ( $P=0/022$ ) و کیست فولیکولار ( $P=0/005$ ) بوده است.



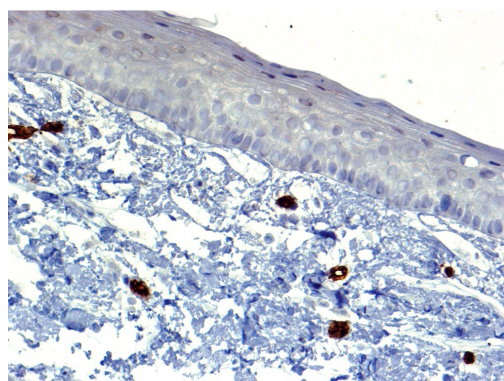
تصویر ۳: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در آملوبلاستومای فولیکولر (X10) رنگ پذیری عروق خونی با نشانگر CD34 در مجاورت اپی تلیوم ادنتوژنیک (عروق خونی با آرایش Circumferential)



تصویر ۱: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در کیست فولیکولار (X10) رنگ پذیری عروق خونی با نشانگر CD34 در مجاورت اپی تلیوم ادنتوژنیک



تصویر ۴: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در آملوبلاستومای پلکسی فرم (X40) رنگ پذیری عروق خونی با نشانگر CD34 در مجاورت اپی تلیوم ادنتوژنیک-آنالیز مورفومتري



تصویر ۲: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در تومور ادنتوژنیک کراتوسیست (X10) رنگ پذیری عروق خونی با نشانگر CD34 در مجاورت اپی تلیوم ادنتوژنیک (آرایش Directional)

جدول ۱: میانگین سن، جنس، محل کیست دنتی ژروس، ادنتوژنیک کراتوسیست و آمولوبلاستوما

نوع ضایعه	تعداد	میانگین سن (سال)	جنس		محل ضایعه	
			مذکر	مونث	فک بالا	فک پایین
کیست فولیکولار	۱۵	۲۲/۳ ± ۴/۸	۸ (۵۳/۲)	۷ (۴۶/۷)	۲ (۱۳/۴)	۱۳ (۸۶/۶)
ادنتوژنیک کراتوسیست	۱۵	۲۸/۲ ± ۲/۳	۱۲ (۸۰/۰)	۳ (۲۰/۰)	۰ (۰/۰)	۱۵ (۱۰۰/۰)
آمولوبلاستوما	۱۵	۳۶/۴ ± ۲/۷	۷ (۴۶/۷)	۸ (۵۳/۳)	۱ (۶/۷)	۱۴ (۹۳/۳)

جدول ۲: ویژگی‌های هیستومورفومتری عروق خونی در ناحیه دور از اپی تلیوم ادنتوژنیک در کیست فولیکولار، ادنتوژنیک کراتوسیست و

آمولوبلاستوما				
نوع ضایعه	(D1) قطر خارجی ( $\mu\text{m}$ )	(D2) قطر داخلی ( $\mu\text{m}$ )	(P) سطح مقطع ( $\mu\text{m}$ )	(D3) ضخامت دیواره ( $\mu\text{m}$ )
کیست فولیکولار	۳۲۴۰۵/۲ ± ۳۶۸۴۳ a***	۱۱۷۸۱/۴ ± ۹۳۹۹ a***	۳۸۸/۷ ± ۱۴۶ a*	۲۴۱۵۵/۳ ± ۳۱۲۵۴۹
ادنتوژنیک کراتوسیست	۳۷۵۱۱/۲ ± ۳۱۴۷۷ a***	۱۴۸۱۲ ± ۱۹۶۳۸ a***	۴۱۱/۹ ± ۱۸۵ a**	۲۳۶۹۹/۱ ± ۱۱۴۳۰۵
آمولوبلاستوما	۶۴۴۳۶/۰۹ ± ۳۹۰۰۴ a***	۳۷۰۳۵/۹ ± ۲۹۶۲۶ a***	۵۵۷/۹ ± ۲۶۶ a***	۲۷۴۰۱ ± ۱۲۴۷۷
P-value	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۵

a تفاوت معنی دار با گروه آمولوبلاستوما \*  $\alpha=0/05$  \*\*  $\alpha=0/01$  \*\*\*  $\alpha=0/001$ 

جدول ۳: ویژگی‌های هیستومورفومتری عروق خونی در ناحیه مجاور اپی تلیوم ادنتوژنیک در کیست دنتی ژروس، تومور ادنتوژنیک کراتوسیست

و آمولوبلاستوما				
نوع ضایعه	(D1) قطر خارجی ( $\mu\text{m}$ )	(D2) قطر داخلی ( $\mu\text{m}$ )	(P) سطح مقطع ( $\mu\text{m}$ )	(D3) ضخامت دیواره ( $\mu\text{m}$ )
کیست فولیکولار	۲۹۳۴۹/۴ ± ۲۲۰۶	۱۷۵۳۴/۶ ± ۱۶۴۸۶	۴۲۰/۲ ± ۱۶۷	۲۲۵۵۳/۵ ± ۱۳۷۰
ادنتوژنیک کراتوسیست	۲۶۶۶/۱ ± ۳۵۶۲	۱۸۷۹۷/۶ ± ۱۷۸۰۵	۴۷۷/۴ ± ۳۷۳	۲۴۷۹۱/۵ ± ۱۱۷۴
آمولوبلاستوما	۴۱۶۰۱/۳ ± ۳۳۱۲۴	۱۹۴۷۶/۸ ± ۲۴۷۰۶	۴۵۹/۸ ± ۳۴۱	۲۲۱۲۴/۵ ± ۱۲۸۳۹
P-value	۰/۸	۰/۸	۰/۶	۰/۴

جدول ۴: ویژگی‌های هیستومورفومتری عروق خونی میانگین کلی قطر خارجی، داخلی، سطح مقطع و ضخامت در کیست دنتی ژروس، تومور

ادنتوزنیک کراتوسیست و آملوبلاستوما

نوع ضایعه	(D1) قطر خارجی ( $\mu\text{m}$ )	(D2) قطر داخلی ( $\mu\text{m}$ )	(P) سطح مقطع ( $\mu\text{m}$ )	(D3) ضخامت دیواره ( $\mu\text{m}$ )
کیست فولیکولار	$37841/8 \pm 21916$ a*	$15103/6 \pm 114146$ a**	$406/9 \pm 158/4$	$21738/2 \pm 12109/9$
ادنتوزنیک کراتوسیست	$41359/9 \pm 28477$ a*	$17329/2 \pm 18479/8$ a*	$453/8 \pm 246/2$	$24030/6 \pm 12691/7$
آملوبلاستوما	$50052/3 \pm 36957$ a*	$25975 \pm 27849$ a*	$496/1 \pm 318/2$	$24077/2 \pm 13545/4$
P-value	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۷	۰/۴
a: تفاوت معنی دار با گروه آملوبلاستوما		* $\alpha=0/05$	** $\alpha=0/01$	

### بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر قطر داخلی، قطر خارجی، سطح مقطع عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما بیشتر از کراتوسیست و کیست فولیکولار بود اما اختلاف آماری معنی‌داری در ارتباط با ضخامت عروق خونی در سه ضایعه ادنتوزنیک فوق مشاهده نشد. از نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که ویژگی‌های مورفومتری عروق خونی (قطر و سطح مقطع) در نواحی محیطی (دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک) بر رفتار تهاجمی بالینی ضایعات ادنتوزنیک مؤثر باشد.

علاءالدینی و همکاران تراکم عروق خونی را در آملوبلاستوما بیشتر از کراتوسیست و کیست دنتی ژروس گزارش کردند اما سطح مقطع عروق خونی را بررسی نکردند.<sup>(۷)</sup> سینی و همکاران نیز تراکم عروق خونی را در نواحی مجاور و دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در ضایعات ادنتوزنیک با رفتار تهاجمی بالینی متفاوت با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (نشانهگر CD34) بررسی کردند. ایشان بیان نمودند که تراکم بیشتر عروق خونی در نواحی مجاور اپی‌تلیوم ادنتوزنیک، در عود و رفتار تهاجمی ضایعات

ادنتوزنیک فوق مؤثرتر است<sup>(۱۷)</sup> تاکنون در مطالعه‌ای ویژگی‌های مورفومتری عروق خونی (سطح مقطع، قطر، ضخامت) در دو ناحیه دور و مجاور اپی‌تلیوم در ضایعات ادنتوزنیک با رفتار تهاجمی بالینی متفاوت بررسی نشده است. تنها در مطالعه Godbil و همکاران<sup>(۸)</sup> بررسی مقایسه‌ای آنژیوژنز با فعالیت پرولیفراسیون در کراتوسیست و کیست دنتی ژروس و مخاط نرمال دهان با روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (CD105 و Ki67) انجام شد. ایشان سطح مقطع کلی عروق خونی، میانگین سطح مقطع عروق خونی و تراکم آن را در کراتوسیست بیشتر از کیست دنتی ژروس و مخاط نرمال گزارش کردند و ارتباط مثبتی در بیان Ki67، TVA، MVA، MVD<sup>۳</sup> مطرح نمودند.<sup>(۸)</sup> نتایج مطالعه Godbil و همکاران<sup>(۸)</sup> بیانگر تاثیر سطح مقطع عروق خونی بر رفتار تهاجمی کراتوسیست نسبت به کیست فولیکولار است و تاییدکننده نتایج مطالعه مذکور است. در مطالعه ما اگرچه قطر و سطح مقطع عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک

1. Total vessel area
2. Mean vessel area
3. Micro vessel Density



خونی در تعیین پیش آگهی مؤثر است.<sup>(۱۸)</sup> Hannen و همکاران نیز علاوه بر تعداد عروق خونی در کارسینوم سلول سنگفرشی، سطح مقطع آن‌ها را بررسی کردند و بیان نمودند که عروق خونی با سطح مقطع عرضی کوچکتر در ضایعات غیرمتاستاتیک بیشتر بوده و عروق خونی با سطح مقطع بزرگتر مرتبط با متاستاز به عقده لنفاوی می‌باشند.<sup>(۱۹)</sup> Terayama و همکاران نیز افزایش سطح مقطع عروق خونی را در نواحی محیطی نسبت به مرکزی تومورهای متاستاتیک کبد گزارش نمودند.<sup>(۲۰)</sup>

مطالعات فوق همگی بیانگر تأثیر سطح مقطع عروق خونی بر روی رفتار تهاجمی و متاستاتیک ضایعات است و به عبارتی دیگر در توافق با مطالعه ما است که سطح مقطع و قطر عروق خونی را در نواحی محیطی ضایعات ادنتوزنیک مؤثر بر رفتار تهاجمی بالینی آن‌ها معرفی می‌کند.

از بررسی مطالعات مختلف این گونه می‌توان حدس زد که تراکم بیشتر عروق خونی در مجاورت اپی‌تلیوم ادنتوزنیک و سطح مقطع و قطر بیشتر عروق خونی در نواحی محیطی و دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک بر عود و رفتار تهاجمی بالینی آن‌ها مؤثر است. به عبارتی رفتار استرومای تومورال در ارتباط با تعداد و سطح مقطع و قطر عروق خونی در نواحی مختلف متفاوت به نظر می‌رسد.

در این مطالعه بیشتر بودن سطح مقطع و قطر عروق خونی در نواحی محیطی کراتوسیست نسبت به کیست فولیکولار می‌تواند بیانگر فعالیت بیشتر عروق خونی در کراتوسیست باشد و به نوعی گویای مکانیسم رشد متفاوت این دو ضایعه ادنتوزنیک است.<sup>(۱)</sup> عقیده بر این است که رشد کیست فولیکولار از طریق Passive و با افزایش فشار اسمزی می‌باشد. اما در رشد کراتوسیست، پرولیفراسیون اپی‌تلیالی و فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز و وجود عروق خونی فعال مؤثر است.<sup>(۱۱)</sup>

در سه ضایعه ادنتوزنیک متفاوت بود، اما در مقایسه ویژگی‌های مورفومتری (قطر، سطح مقطع و ضخامت عروق خونی) در نواحی مجاور اپی‌تلیوم ادنتوزنیک در آملوبلاستوما، کراتوسیست و کیست فولیکولار تفاوتی مشاهده نشد. به نظر می‌رسد آن چه که در عود و رفتار تهاجمی بالینی آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست و کیست فولیکولار مؤثر است، سطح مقطع و قطر عروق خونی در نواحی مجاور اپی‌تلیوم ادنتوزنیک نباشد بلکه ویژگی‌های مورفومتری (قطر و سطح و مقطع) در نواحی محیطی ضایعات ادنتوزنیک بر رفتار بالینی آن‌ها مؤثر است. افزایش سطح مقطع و قطر عروق خونی محیطی در آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست و کیست فولیکولار می‌تواند بیانگر وجود عروق خونی فعال‌تر جهت تامین نیازهای تغذیه‌ای و متابولیسم در این ضایعه ادنتوزنیک باشد.

در مطالعه Korkolopoulou و همکاران، بررسی عروق خونی در انواع مهاجم و سطحی کارسینوم مثانه با روش ایمونوهیستوشیمی (CD31) و مورفومتری صورت گرفت. آن‌ها سطح مقطع و تراکم عروق خونی را در پیش‌گویی رفتار تهاجمی ضایعات در انواع مهاجم کارسینوم مثانه مؤثر دانستند. ایشان در این مطالعه گزارش نمودند که تنها فاکتور مشخص‌کننده و تعیین‌کننده و مؤثر بر رفتار تهاجمی ضایعات فوق MVD (تراکم عروق خونی) نیست، بلکه سطح مقطع، قطر داخلی و خارجی و شکل و شدت رنگ‌پذیری سلول‌های آندوتلیال در این زمینه مؤثر است.<sup>(۱۱)</sup> که به نوعی تاییدکننده نتایج مطالعه مذکور است.

Rubio و همکاران نیز در بررسی کارسینوم نازوفازنکس با روش ایمونوهیستوشیمی با نشانگرهای CD31، CD34، FVIII گزارش کردند که در کارسینوم‌هایی با تراکم عروقی بیشتر، سطح مقطع عروق

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی مؤثر باشد.<sup>(۲۴)</sup>

برخی از محققان، غلظت پایین عوامل آنژیوژنیک را در ایجاد شبکه عروقی مؤثر دانستند، اما مطرح کردند که افزایش میزان فاکتورهای آنژیوژنیک، بیشتر بر روی تعداد عروق خونی مؤثر است.<sup>(۲۵)</sup> تا تغییر در اندازه و سطح مقطع آن‌ها به نظری می‌رسد که در مطالعه حاضر تفاوت سطح مقطع و قطر عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوژنیک به دلیل وجود ایزوفرم‌های مختلف VEGF با عملکردهای متفاوت در ماتریکس خارج سلولی آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست و کیست فولیکولار باشد.

همواره این سؤال مطرح است که آیا عروق خونی به صورت تصادفی در کنار یکدیگر و در ارتباط با غشاء پایه قرار گرفته‌اند و یا عواملی در کنترل آرایش عروق خونی در این ضایعات ادنتوژنیک نقش دارند؟ با مروری بر مکانیسم آنژیوژنز به نظر می‌رسد که عامل اصلی تعیین و القاء کننده آرایش عروق خونی، اپی‌تلیوم ادنتوژنیک، میزان فعالیت و نیاز متابولیسم آن باشد اما عوامل موجود در استروما نیز در این زمینه نقش دارند.<sup>(۲۶ و ۲۷)</sup>

در بررسی ضایعات ادنتوژنیک در مطالعه حاضر آرایش متفاوت عروق خونی به چشم می‌خورد. در آملوبلاستوما آرایش Circumferential مشاهده می‌گردد که عروق خونی در امتداد غشاء پایه و در اطراف جزایر فولیکولار و پلکسی فرم قرار گرفته‌اند اما در کراتوسیست و کیست فولیکولار، آرایش Directional غالب بوده و اکثر عروق خونی زاویه‌دار یا عمود بر غشاء پایه نمایان هستند.

Haigh و همکاران بیان کردند که اختلاف در آرایش عروق خونی در ضایعات مختلف مرتبط با میزان فاکتور آنژیوژنیک تولید شده توسط بافت هیپوکسیک است. در شرایط معمول، VEGF باند شده به پروتئین‌های

در این مطالعه میانگین کلی قطر داخلی و خارجی در آملوبلاستوما بیشتر از دو ضایعه ادنتوژنیک دیگر بود. اما با وجود بیشتر بودن میانگین کلی سطح مقطع و ضخامت عروق خونی اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج مطالعه حاضر تأییدکننده تأثیر اندازه قطر داخلی و خارجی عروق خونی بر رفتار تهاجمی آملوبلاستوما نسبت به دو ضایعه ادنتوژنیک دیگر است.

اگرچه اکثر مطالعات ویژگی‌های مورفومتري عروق خونی (سطح مقطع، قطر داخلی و خارجی) را در رفتار تهاجمی آنها تأیید کردند برخی از مطالعات تأثیر این ویژگی‌ها را بر رفتار تهاجمی و پیش‌آگهی ضایعات رد کردند<sup>(۱۲)</sup>، به نظر می‌رسد عمده‌ترین علت تفاوت نتایج مطالعات مختلف، روش بررسی می‌باشد. این که ویژگی‌های مورفومتري عروق خونی در چه فاصله‌ای از اپی‌تلیوم تعیین شود می‌تواند در نتایج مطالعات مؤثر باشد. برخی از مطالعات از روش چشمی و بعضی دیگر از آنالیز مورفومتري (کامپیوتری) جهت تحقیق استفاده کردند. برخی از محققان برای بررسی آنژیوژنز Hot spots (نواحی با بیشترین تراکم عروق خونی) را مورد بررسی قرار دادند<sup>(۱۸)</sup> و محققان دیگر، طبقه‌بندی جهت تراکم عروق خونی (>۱۰۰، ۶۸-۱۰۰، ۳۴-۶۷، ۰-۳۳) را بیان نمودند.<sup>(۲۱)</sup>

همچنین نوع نشانگر مورد استفاده جهت بررسی تراکم عروق خونی (CD31, CD34, CD105, FVIII) در مطالعات مختلف، متفاوت است. تعداد فیلد میکروسکوپی و اندازه بزرگنمایی در مطالعات مختلف با یکدیگر فرق دارد.<sup>(۲۲)</sup>

برخی از مطالعات جهت بررسی عروق خونی از روش‌های فلوسیتومتري<sup>(۲۱)</sup>، ایمونوهیستوشیمی<sup>(۲۰)</sup> و یا رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین<sup>(۲۳)</sup> استفاده کرده‌اند. به نظری می‌رسد طبقه آماده سازی بافت نیز بر نتایج حاصل از

ادنتوزنیک تأثیری بر ضخامت دیواره عروق خونی نداشته است به طوری که اختلاف آماری معنی‌داری در ضخامت دیواره عروق خونی در سه ضایعه ادنتوزنیک فوق وجود نداشت.

همچنین می‌توان این گونه بیان کرد که در سه ضایعه ادنتوزنیک فوق با رفتار بالینی متفاوت، آماس موجود در استروما تنها در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک بر روی قطر داخلی و خارجی و سطح مقطع عروق خونی موثر بوده ولی هیچ اثری بر روی ضخامت عروق خونی در نواحی دور یا مجاور اپی‌تلیوم ادنتوزنیک نداشته است.

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد قطر داخلی، خارجی، سطح مقطع عروق خونی در نواحی دور از اپی‌تلیوم ادنتوزنیک و نوع آرایش عروق خونی در مجاورت اپی‌تلیوم ادنتوزنیک بر رفتار تهاجمی بالینی آملوبلاستوما نسبت به کراتوسیست و کیست فولیکولار موثر باشد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر، حاصل طرح پژوهشی منتج از پایان نامه به شماره ۴۶۹ است که بدینوسیله از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تقدیر و تشکر می‌گردد.

و وقتی دستور تشکیل رگ خونی جدید توسط اپی‌تلیوم القاء می‌شود، با عملکرد ماتریکس متالوپروتئیناز، VEGF باند شده تبدیل به VEGF آزاد و دارای عملکرد می‌گردد.<sup>(۲۸)</sup> همچنین به طور غیرمستقیم تعداد و سطح مقطع و قطر عروق خونی بر روی آرایش حاصل شده مؤثر است.

در بررسی مقالات انگلیسی زبان تنها در یک مطالعه آرایش عروق خونی در تکامل تومور حنجره بررسی شده است. Laitakari و همکاران آرایش عروق خونی را مرتبط با درجه تمایز در کارسینوم سلول سنگفرشی گزارش کردند. آنژیوژنز Circumferential در کارسینوم سلول سنگفرشی تمایز یافته و آرایش Directional در کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز متوسط و آرایش Aberrant در کارسینوم سلول سنگفرشی با تمایز ضعیف یافت شد. ایشان اندازه، شکل و ساختار عروقی را با طرح رشدی و رفتاری تومورال مرتبط دانستند.<sup>(۲۹)</sup>

برخی از مطالعات ارتباط نشانگرهای التهاب و فعالیت سلول‌های آندوتلیال و افزایش ضخامت دیواره کاروتید را موثر دانستند.<sup>(۳۰)</sup> اگرچه در مطالعه حاضر شدت آماس در استرومای ضایعات ادنتوزنیک بررسی نشد اما با مشاهده نتایج مطالعه می‌توان اینگونه حدس زد که آماس چه در نواحی مجاور اپی‌تلیوم و چه در نواحی دور از اپی‌تلیوم

### منابع

1. Nevill BW, Dam DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2009. P. 685-6.
2. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: Is it a benign cystic neoplasm; Part 1. Clinical and experimental evidence of aggressive behavior. Oral Oncol 2002; 38(3): 219-26.
3. Deihimi P. Tooth Pathology and Odontogenic Lesions. 1<sup>st</sup> ed. Isfahan: Kankash CO; 2006. P. 379-80. (Persian)
4. Thosapom W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Wg KH. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst and ameloblastoma. Oral Dis 2004; 10(1): 22-60.
5. Olaspiji HO, Pindiga UH, Tahir AA. Ameloblastoma in young person's: A retrospective study of clinicopathologic features and treatment of 19 cases from semi urban Nigerian teaching hospital. Pak Oral Dental J 2005; 25(1): 15-20.
6. Norimogehi MH, Mahmoodzadeh saghebheidari HR. Methods and terminology of histotechnique sterology and morphometry. 3<sup>rd</sup> ed. Tehran: Publication and Print Co; 1382. P. 220, 337. (Persian)

7. Alaeddini M, Salah S, Dehghan F, Eshghyar N, Etemadmoghadam S. Comparision of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous cysts and ameloblastomas. *Oral Dis* 2009; 15(6): 422-7.
8. Godbil AR, Hinde A, Ghaudhary M, Nikam A, Gawande M, Pital S, et al. Tumor angiogenesis in keratocystic odontogenic tumor assessed by using CD-105 antigen. *J Oral Pathol Med* 2011; 40(3): 263-9.
9. Sekine J, Uehara M, Hideshima K, Irie A, Inokuchi T. Predictability of lymphoid metastases by preoperative nuclear morphometry in squamous cell carcinoma of tongue. *Cancer Detect* 2003; 27(6): 427-33.
10. Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzias N. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: A morphometric study. *Leukemia* 2003; 17(1): 89-91.
11. Korkolopoulou P, Konstantinidou AE, Kavantzias N, Patsouris E, Paulopoulos PM, Christodoulou P, et al. Morphometric microvascular characteristics predict prognosis in superficial and invasive bladder cancer. *Virchows Arch* 2001; 438(6): 603-11.
12. Shama S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: A conceptual overview, histoprognotic prespective and significance of neoangiogenesis. *Histopathol* 2005; 46(5): 481-9.
13. Weidner N. Measuring intratumoral Microvessel density. *Methodos Enzymol* 2008; 444: 305-23.
14. Wang XL, Fang JP, Tang RY, Chen XM. Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: A retrospective study of 123 cases. *BMC cancer* 2010; 10: 299-303.
15. Masjedi F, Dabiri SH, Jaradi A. Preventive effect of garlic on blood glucose levels and histopathology of pancreas in streptozotocin induced diabetes in rats. *Physiol Pharmacol* 2009; 13: 179-90.
16. Seifi S, Shafaei SH, Shafigh E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblast stromal present and distribution in squamous epithelial carcinomas, Oral dysplasia and hyperkeratosis. *Asian Pac J Cancer Prer* 2010; 11(2): 35-64.
17. Seifi S, Shafaei S, Ghadiri S. Microvessel density in follicular cysts, keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12 (2): 351-6.
18. Rubio L, Burgos JS, Morera C Vera-sempere FJ. Morphometric study of tumor angiogenesis as a new prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma patients. *Pathol Oncol Res* 2000; 6(3): 210-6.
19. Hannen EJ, Riediger D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 2-7.
20. Terayama N, Terada T, Nakanuma Y. A morphometric and Immunohistochemical study on angiogenesis of human metastatic carcinomas of the liver. *Hepatology* 1996; 24(4): 416-9.
21. Weidner N, Folkman J, Pozza F. Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcimoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(24): 1875 -87.
22. Luukka H, Laitakari J, Vahlberg T, Klemi P, Grenman R. Morphometric analysis using automated image analysis of CD34 positive vessels in salivary gland acinic cell carcinoma. *Acta Otolaringol* 2007; 127(8): 869-73.
23. Baeten CIM, Wagstaff J, Verhoeven LCL, Hillen HFP, Griffioen AW. Flow cystometric quantification of tumor endothelial cell; An objective alteration for microvessel density assessment. *Br J Cancer* 2002; 87(3): 344-7.
24. Samejima NJ, Yamazaki K. A study on the vascular proliferation in tissues around the tumor in breast cancer. *Jpn Surg* 1988; 18(3): 235-42.
25. Taylor CR, Shi SR, Barr NY. *Diagnostic Immunohistochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: W.B. Saunders Co; 2010. P. 18-20.
26. Ross A, Rizk N, O`Riordan MA, Dogra V, El-Bojjani D, Storer N, et al. Relationship between Inflammatory markers endothelial activation markers, and carotid Intima-media thickness in HIV-Infected patients receiving antiretrival therapy. *CID* 2009; 49(7): 1119-27.
27. Mylone E, Nemikos A, Alexandrou P, Giannopoulou I, Kermapoulou A, Nakopoulou L, et al. Lymphatic and blood vessel morphometry in invasive breast carcinoma : Relation with proliferation and VEGF C and D expression. *Histopathol* 2007; 22(8): 825-35.
28. High JJ, Morelli PI, Gerhard H, Haigh K, Tsein J. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reduction in VEGF-A paracrine signaling. *Ber Biol* 2003; 262(2): 225-41.
29. Laitakari J, Nayha V, Stenback F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumor development. *J Clin Pathol* 2004; 57(4): 390-401.
30. O`leary DH, Polok JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular health study collaborative research group. *N Engl J Med* 1999; 340(1): 14-22.