

ارزیابی آنژیوژنز در کارسینوم سلول بازال پوست با استفاده از شاخص‌های CD31 و CD34 و تعیین ارتباط آن با الگوی مهاجم در بافت‌شناسی

زمینه و هدف: آنژیوژنز نقش مهمی در رشد تومورها ایفا می‌کند. شواهد موجود نقش احتمالی این پدیده را در بروز خصوصیات تهاجمی و نیز متاستاز تومورها نشان می‌دهند. کارسینوم سلول‌های بازال (BCC) و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی (SCC) پوست علی‌رغم منشا مشابه، رفتار متفاوتی در زمینه تهاجم و متاستاز دارند. مطالعه حاضر نقش احتمالی فرآیند آنژیوژنز را در زمینه بروز رفتار تهاجمی تومورهای BCC پوست در انواع مختلف این تومور بررسی کرد.

روش اجرا: ۵۰ نمونه BCC با رنگ‌آمیزی H&E و ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال CD31 و CD34 رنگ‌آمیزی شدند و میانگین و انحراف معیار دانسیته میکروواسکولر (MVD) بر طبق یک متد یکسان در استروما و بدنه انواع BCC شامل ندولر، میکروندولر، سطحی و اسکروزینگ اندازه‌گیری شد. برای مقایسه میانگین دانسیته عروقی نمونه‌ها از آزمون‌های Kruskal-Wallis, Mann-Whitney استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین MVD بدنه در انواع مهاجم BCC (اسکلروزینگ و میکروندولر) $27.09 \pm$ و 177 و در انواع غیرمهاجم (انواع ندولر و سطحی) 127 ± 0.79 در بررسی با مارکر CD31 بود و این دو گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. میانگین بدنه تومور در انواع مهاجم 180 ± 1.03 و در انواع غیرمهاجم 113 ± 0.70 در بررسی با مارکر CD34 بود و این دو گروه نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. میانگین MVD در استرومای انواع مهاجم BCC $73/73 \pm 3/65$ و در انواع غیرمهاجم $69/69 \pm 3/70$ برحسب مارکر CD31 بود و این دو گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. میانگین MVD استرومای انواع مهاجم BCC $68/68 \pm 3/24$ و در انواع غیرمهاجم $64/64 \pm 3/11$ برحسب مارکر CD34 بود و این دو گروه نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند.

نتیجه‌گیری: دانسیته میکروواسکولر با خاصیت تهاجمی و متاستاز در تومورها مرتبط می‌باشد و عروق بدنه تومور نقش مهم‌تری در این زمینه ایفا می‌کنند.

کلمات کلیدی: آنژیوژنز، کارسینوم سلول‌های بازال پوست، متاستاز، تهاجم، دانسیته و میکروواسکولر

دریافت مقاله: ۸۹/۶/۳ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۲۸

پوست و زیبایی؛ پاییز ۱۳۸۹، دوره ۱ (۳): ۱۱۸-۱۱۲

دکتر زهرا صفایی‌نراقی^۱

دکتر مهدی حدیثی^۱

دکتر فیروز امانی^۲

سولماز فتحی^۳

۱. گروه آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم

پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. گروه آمارزیستی، دانشگاه علوم پزشکی

اردبیل، اردبیل، ایران

۳. گروه مامایی، دانشگاه علوم پزشکی

اردبیل، اردبیل، ایران

نویسنده مسؤول:

دکتر زهرا صفایی‌نراقی

تهران، میدان وحدت اسلامی، بیمارستان

رازی، پست الکترونیکی:

Biostat.f@gmail.com

مقدمه

می‌دهد. درحالی‌که کارسینوم سلول‌های سنگفرشی Squamous Cell Carcinoma (SCC) دیگر تومور بدخیم غیرملانومایی پوست می‌باشد که با BCC دارای منشاء مشابهی است ولی قابلیت متاستاز دارد^۱.

کارسینوم سلول بازال Basel Cell Carcinoma (BCC) شایع‌ترین تومور بدخیم پوستی است که علی‌رغم قابلیت تهاجم موضعی به‌ندرت متاستاز

با توجه به رفتار متفاوت سلول‌های SCC و BCC علی‌رغم منشاء مشابه آن‌ها، این نظریه مطرح است که تفاوت احتمالی در کیفیت آنژیوژنز در این تومورها علت و سرمنشاء رفتار متفاوت بیولوژیک آن‌ها می‌باشد^{۲۹۱۷}.

از این جهت بررسی MVD به‌عنوان شاخص وضعیت آنژیوژنز در BCC می‌تواند به شناخت بهتر ماهیت متفاوت این تومور در مقایسه با SCC، پیش‌بینی بروز رفتار تهاجمی یا متاستاز در تومور و انتخاب روش‌های درمانی بر مبنای بیان متفاوت آنژیوژنز در انواع این تومور کمک اساسی نماید.

در این مطالعه جهت بررسی بهتر و دقیق‌تر فرآیند آنژیوژنز از Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (CD31) و CD34 به‌عنوان شاخص‌های بررسی وجود آنژیوژنز استفاده شده‌است. CD31 آنتی‌ژن پیش‌سازهای هماتوپویتیک ER-MP12 را بیان می‌کند و به‌عنوان یکی از حساس‌ترین و مفیدترین مارک‌های سلول‌های اندوتلیال معرفی شده‌است. CD34 سلول‌های اندوتلیال نرمال و نئوپلاستیک را رنگ می‌کند و البته کمتر از CD31 اختصاصی است. این دو مارکر روی سلول‌های اندوتلیال عروقی قرار دارند و در مقایسه با هم در بررسی عروق استروما و نیز در عروق بدنه تومور مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه بررسی میزان آنژیوژنز در BCC در بدنه و استرومای تومور با استفاده از شاخص MVD و ارتباط آن با الگوی تهاجم این تومور بود.

روش اجرا

این مطالعه به روش توصیفی - مقطعی انجام شد. ۵۰ نمونه بیوپسی تومورهای BCC با اندازه بزرگتر از ۰/۵ سانتی‌متر در بیمارانی که در سال ۱۳۸۵ به بخش پاتولوژی بیمارستان رازی مراجعه کرده بودند، جامعه آماری مطالعه حاضر را تشکیل می‌دادند.

آنژیوژنز یا تولید مویرگ‌های جدید از رگ‌هایی که قبلاً وجود داشته‌اند، فاکتوری مؤثر در مراحل متعدد در رشد و متاستاز تومورهای توپیر می‌باشد^{۲-۵}. به‌همین خاطر دانسیته میکروواسکولر (Micro Vascular Density) به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی وضعیت آنژیوژنز در تومورها و عامل پیشگویی‌کننده رفتار تهاجمی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است^۶. با وجود مقالات گسترده در زمینه آنژیوژنز در فرآیند نئوپلاستیک تومورها، نخستین بار در سال ۱۹۹۱ میلادی از MVD یا میانگین دانسیته میکروواسکولر به‌عنوان یک نشانگر برای پیشگویی وقوع متاستاز در سرطان‌های پستان یاد شد و پس از آن این شاخص در تومورهای مختلف به‌کار گرفته شد^{۷-۱۰}.

در یک مطالعه در مقایسه بین SCC و BCC به نقش آنژیوژنز در تفاوت در مسیر رشد و توانایی متاستاز اشاره و به خصوص بر اهمیت نقش VEGF (فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) تأکید و بیان شده که VEGF هم در پوست مجاور تومور و هم در تومور و در لایه کراتینوسیت بازال اپیدرم بیان می‌شود. در این مطالعه الگوی بیان VEGF در SCC و BCC به‌عنوان احتمال تفاوت در رفتار بیولوژیک این تومورها معرفی شده‌است^{۱۱}.

این در حالی است که وجود ارتباط بین MVD با تهاجم و متاستاز در تومورهای SCC نواحی دیگر مانند سرویکس، حنجره، پوست و ... در مطالعات مختلف ذکر شده‌است^{۱۲-۱۴}. مساله مبهم در این زمینه وضعیت آنژیوژنز در BCC و تومورهای مانند آن است که خاصیت تهاجم موضعی ولی قابلیت متاستاز کمی دارند.

مطالعات ویدئوآنژیوگرافی BCC با استفاده از فلورسئین^{۱۵} و نیز مطالعات *in vivo* با کمک ویدئومیکروسکوپی روی این تومورها^{۱۶}، الگوی عروقی متمایزی را در مقایسه با پوست نرمال نشان داده‌است.

گردید. سپس لام‌ها مجدداً با بافر تریس به مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعدی از محلول DAB+ جهت کروموزن استفاده شد و لام‌ها با این کروموزن به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. جهت حذف مواد ناخواسته از لام‌ها، مجدداً شست‌وشو با آب جاری انجام شد. جهت رنگ زمینه لام‌ها به مدت ۱ دقیقه در هماتوکسیلین قرار داده شدند. در این مرحله جهت Dehydration (آب‌گیری) از الکل‌های ۹۶ درجه و ۱۰۰ درجه و سپس از گزلیلول استفاده شد. در مرحله بعدی عمل Mounting لام‌ها و چسباندن لام‌ها با چسب و لامل انجام گردید. نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با تکنیک H&E برای تأیید تشخیص، طبقه‌بندی براساس تهاجم و عمق نفوذ تومور بررسی شدند. برش‌های رنگ‌آمیزی شده با تکنیک ایمونوهیستوشیمی در ابتدا با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر جهت تعیین نقاط پرتراکم (Hot Spots) بررسی شدند.

از میان نقاط پرتراکم هر نمونه، سه نقطه که دارای بیشترین تراکم بودند انتخاب شده و شمارش عروق استروما و بدنه تومور در این نقاط با استفاده از بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر صورت گرفت (لازم به ذکر است که این مراحل عیناً هم در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر ایمونوهیستوشیمی CD31 و هم در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با مارکر CD34 به صورت مجزا در عروق استروما و عروق بدنه تومور انجام شد). میانگین تعداد عروق شمارش شده در این سه نقطه به تفکیک استروما و بدنه تومور به عنوان MVD در هر نمونه در نظر گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری شده با شاخص‌های میانگین، انحراف معیار و فراوانی، بیان و برای مقایسه میانگین MVD از آزمون‌های χ^2 ، Mann Whitney و Kruskal Wallis استفاده شد. نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc, IL, USA) نسخه ۱۵ استفاده شد و $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

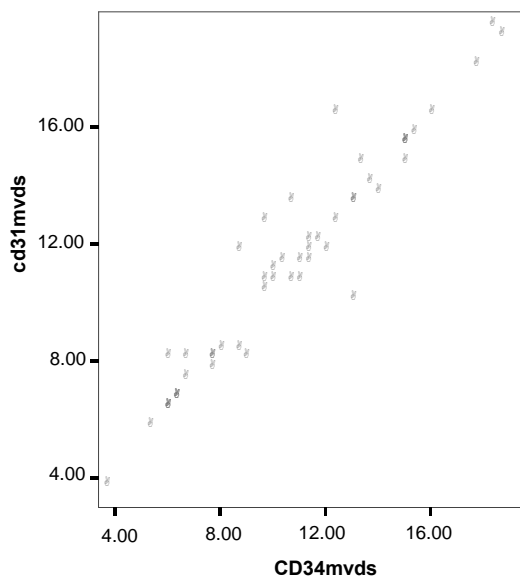
بلوک‌های انتخاب شده با لام‌های هماتوکسیلین - ائوزین آنها مطابقت داده شد تا هم از حصول تشخیص اولیه و هم از نظر وجود مقدار کافی بافت موردنظر اطمینان حاصل گردد. سپس با آرشیو بلوک‌ها و لام‌های انتخاب شده بیماران مطابقت داده شده و سن و جنس بیماران نیز ثبت گردید.

از هر بلوک پارافینی دو برش با ضخامت ۳ میکرون یکی برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی CD31 و دیگری برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی CD34 تهیه گردید. بلوک‌ها با ضخامت موردنظر روی لام پلی‌لازین برش و به مدت یک ساعت در اتوکلاو ۶۰ درجه قرار داده شدند و سپس به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد Overnight شدند. سپس لام‌ها برای دپارافینه‌شدن و دهیدراته‌شدن در گزلیلول، الکل ۱۰۰ درجه، الکل ۹۶ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن در آب اکسیژنه ۳۰٪ همراه با متانول به نسبت ۹ به ۱ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله بعدی جهت Antigen retrieval (قابل استفاده نمودن) مراحل زیر انجام گرفت: شست‌وشوی لام‌ها با آب مقطر و گذاشتن لام‌ها در بافر سیترات با pH = 6 به مدت ۱۵ دقیقه؛ استفاده از محلول بلوک‌کننده Protein blocking جهت مهار پراکسیداز اندوژن و از بین رفتن nonspecific reaction به مدت ۱۰ دقیقه.

در مرحله بعدی آنتی‌بادی‌های CD31-Ready to use و CD34-Ready to use ریخته شده و به مدت ۱ ساعت انکوبه گردیدند (قابل ذکر است آنتی‌بادی‌ها با مشخصات CD31 Code NO: N-1596 و CD34 Code No: N-1632 از نمایندگی کمپانی DAKO خریداری شده بودند). در مرحله بعدی لام‌ها با بافر تریس به مدت ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند. آنگاه از Envision TM+ نوع Mouse / Rabbit جهت Detection system به مدت ۳۰ دقیقه استفاده

غیرمهاجم دارای رقمی بیشتر از آن بودند. تعداد ۱۲ نمونه از انواع مهاجم و تعداد ۱۷ نمونه از انواع غیرمهاجم دارای رقم کمتر از مقدار میانگین عمق نفوذ و تهاجم بودند. مقدار عمق نفوذ تومور در بین نمونه‌های بیشتر از میانگین و نمونه‌های کمتر از میانگین در دو گروه یکسان بود. ضریب همبستگی بین متغیرهای MVD عروقی استرومای انواع مختلف در بررسی با مارکرهای CD31 و CD34 برابر $r=0/96$ و معنی‌دار بود (نمودار ۱).

ضریب همبستگی بین متغیرهای MVD بدنه این انواع برابر $r = 1$ و معنی‌دار بود که نشان‌دهنده وجود یک رابطه خطی کامل بین این دو مارکر است. به‌ویژه در مورد MVD عروق بدنه این تومورها و مقادیر به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تبعیت این مقادیر از هم می‌باشد (نمودار ۲).



$$r = 0/96 \text{ و } p < 0/001$$

نمودار ۱: پراکنش بین متغیرهای MVD استرومای BCC برحسب مارکر CD31 با MVD استروما برحسب مارکر CD34

این مطالعه بر روی بلوک‌های پارافینی آرشیو بخش پاتولوژی بیماران بیمارستان رازی انجام شد و هیچ گونه خطر جسمی و روحی ناشی از این طرح برای بیماران وجود نداشت. هم‌چنین لازم به ذکر است که اطلاعات مربوط به بیماران محرمانه بوده و نتایج بدون اشاره به نام و هویت بیماران، بیان شدند.

یافته‌ها

در بررسی تعداد ۵۰ عدد نمونه BCC شامل ۸ نمونه اسکروزینگ، ۱۹ نمونه میکروندولر، ۱۶ نمونه ندولر و ۷ نمونه سطحی، نتایج زیر به‌دست آمد:

میانگین سنی افراد مرتبط با نمونه‌های مورد مطالعه $13/9 \pm 62/3$ سال بود. ۳۴ نفر (۶۸٪) از افراد مورد بررسی مرد و ۱۶ نفر (۳۲٪) زن بودند. جوان‌ترین، بیمار دختری ۸ ساله و مسن‌ترین مردی ۹۰ ساله بود. میانگین MVD استروما در نمونه‌های مهاجم BCC (اشکال اسکروزینگ و میکروندولر) $3/73 \pm 11/65$ و در نمونه‌های غیرمهاجم (انواع ندولر و سطحی) $3/69 \pm 10/70$ در بررسی با مارکر CD31 بود. میانگین MVD استروما در نمونه‌های مهاجم $3/68 \pm 11/24$ و در غیرمهاجم $3/67 \pm 10/74$ در بررسی با مارکر CD34 بود که بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

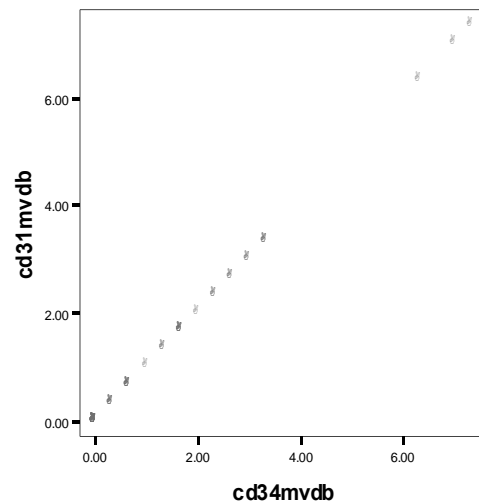
میانگین MVD بدنه در نمونه‌های مهاجم BCC $2/09 \pm 1/77$ و در غیرمهاجم $1/27 \pm 0/79$ در بررسی با مارکر CD31 بود. میانگین MVD بدنه در انواع مهاجم BCC $1/80 \pm 1/03$ و در غیرمهاجم $1/13 \pm 0/70$ در بررسی با مارکر CD34 بود که اختلاف بین دو گروه در هر دو مورد معنی‌دار بود. میانگین عمق نفوذ تومور یا تهاجم در نمونه‌های مورد مطالعه $2/54 \pm 4/23$ میلی‌متر و میانه عمق نفوذ تومور $3/5$ میلی‌متر بود.

تعداد ۱۴ نمونه از انواع مهاجم رقمی بیشتر از مقدار میانگین عمق نفوذ و تعداد ۷ نمونه از انواع

در مطالعه حاضر نیز بالاتر بودن MVD در نمونه‌های BCC مهاجم در بررسی با هر دو مارکر CD31 و CD34 تأیید شد و این امر نمایانگر ارتباط MVD با خاصیت تهاجمی در تومورهای مذکور می‌باشد. آنچه که در بررسی آنژیوژنز باید مورد توجه قرار گیرد این است که علی‌رغم شباهت سلول‌های اندوتلیال عروق خونی و لنفاوی، در BCC بر خلاف SCC این عروق صرفاً عروق خونی هستند.^{۲۰}

نکته مهم این است که وجود اختلاف معنی‌دار در دانسیته عروقی بدنه تومورهای BCC برحسب انواع مهاجم و غیرمهاجم و عدم وجود اختلاف معنی‌دار در دانسیته عروقی استرومای این تومورها می‌تواند به روشنی مطرح‌کننده این فرضیه باشد که عروق بدنه بیشتر از عروق استروما در گسترش این تومورها و ایجاد الگوی مهاجم نقش دارند و این یافته با پیش‌فرض‌ها مطابقت دارد. جهت تأکید بر اهمیت نقش عروق بدنه تومور می‌توان به مطالعه‌ای اشاره کرد که در آن با بررسی الگوهای edvin، سیر الگوهای ۱ (تعداد عروق محیطی و مرکزی محدود)، ۲ (عروق محیطی زیاد و عروق مرکزی کم) و ۳ (عروق مرکزی و محیطی متعدد) به سمت پیش‌آگهی نامطلوب‌تر در SCC بوده که تأییدکننده فرضیه مطرح شده در مطالعه حاضر است^{۲۱}. به عبارتی افزایش عروق مرکزی که معرف عروق بدنه تومور است با پیش‌آگهی بدتر همراه بوده است. با توجه به رفتار بیولوژیک مشابه در سلول‌های اسکواموس بدخیم می‌توان انتظار رویداد مشابه ریه را در SCC پوست هم داشت.

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۳ میلادی بر روی ۵۰ نمونه BCC، ۳۳ نمونه تریکوآپی‌تلیوما، ۲۲ نمونه SCC و ۶ نمونه پوست نرمال صورت گرفت، پیشنهاد شد که بررسی نمونه‌های BCC که در بدنه آنها آنژیوژنز وجود دارد (همانند نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر) و مقایسه آن با نمونه‌های SCC، فرصت مناسبی را برای آزمون فرضیه نقش آنژیوژنز در



$$r = 0.96 \text{ و } P < 0.001$$

نمودار ۲: پراکنش بین متغیرهای MVD بدنه BCC برحسب مارکر CD31 با MVD بدنه برحسب مارکر CD34

بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی میزان آنژیوژنز در استروما و در بدنه انواع مختلف BCC با دو مارکر CD31 و CD34، نشان داد که پدیده آنژیوژنز و مخصوصاً میانگین MVD در بدنه انواع مهاجم BCC شامل میکرو ندولرو اسککلروزینگ بیشتر از انواع غیرمهاجم شامل ندولرو سطحی می‌باشد. یک مطالعه بر روی ۳۵ نمونه پوست نرمال، آکتینیک کراتوزیس، بیماری Bowen و SCC^{۱۸} و هم‌چنین یافته‌های مطالعه دیگری در مورد مقایسه نوع مهاجم BCC و تومور غیرمهاجمی مثل اکتینیک کراتوزیس^{۲۴}، نشان داده که یافته فوق با پیش‌فرض‌ها مطابقت دارد.

در مطالعات مشابه دیگر، بیشتر بودن MVD تومورهای SCC در مقایسه با BCC و همراهی افزایش MVD با درجات آنپلازی تومور SCC، کاهش درجه تمایز آن و افزایش عمق نفوذ و متاستاز گزارش شده است.^{۱۹}

پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده تأکید روی نمونه‌های نادر متاستاز دهنده و گروه‌های مهاجم BCC (که در بعضی مقالات تحت عنوان BCC2^{۳۲} طبقه‌بندی شده)، باشد تا بتوان به شواهد قطعی‌تری در بررسی ماهیت تهاجمی این گروه دست پیدا کرد. هم‌چنین شاید بتوان در درمان فعلی BCC با تأکید ویژه در تعیین شاخص‌های پروگنوستیک در انواع مهاجم و غیرمهاجم و میزان آنژیوژنز آنها اقدامات درمانی مفیدتری به‌منظور بهبود پروگنوز گروه‌های در معرض خطر بالا انجام داد.

تقدیر و تشکر

گروه محققین از پرسنل بزرگوار بخش پاتولوژی بیمارستان رازی، بخش I.H.C بیمارستان دکتر علی شریعتی، به‌خصوص سرکار خانم پری‌سیما عظیمی، تالیپست‌های محترم و کلیه عزیزانی که به‌نحوی در مراحل مختلف تحقیق، نگارش و ویرایش این مقاله تحقیقاتی شرکت کرده‌اند، تشکر و قدردانی می‌کند.

تفاوت رفتارهای تومورهای BCC و SCC فراهم می‌کند.^۲

در مطالعه فعلی نکته جالب این است که با بررسی هر دو مارکر CD31 و CD34، بین میانگین MVD عروق استروما در انواع مهاجم و غیرمهاجم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، درحالی‌که در بدنه تومور این اختلاف معنی‌دار بود. نکته مهم دیگر در بررسی دو مارکر CD31 و CD34 این است که یک رابطه خطی بخصوص در MVD عروق بدنه تومور بین این دو مارکر وجود دارد و نشان می‌دهد که مقادیر به‌دست‌آمده از این دو متغیر کاملاً از هم تبعیت می‌کند. شاید خطی‌تر بودن این رابطه در عروق بدنه به این خاطر است که تراکم عناصر موجود در استرومای تومورها تا حدودی باعث رنگ‌پذیری غیراختصاصی برای عروق در استروما شود. در مجموع یافته‌های این مطالعه می‌تواند تأکیدی بر اهمیت عروق بدنه BCC در بروز خاصیت تهاجم و حتی متاستاز در این تومور باشد.

References

1. Mackie RM, Quinn AG, Non - melanoma skin cancer and other epidermal skin tumors. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (editors). Rook's textbook of dermatology. New York; Blackwell Science, 2004: 19-36.
2. Chin CW, Foos AJ, Stevens A, Lowe J. Differences in the vascular patterns of basal and squamous cell skin carcinomas explain their differences in clinical behaviour. J Pathol 2003; 200: 308-13.
3. Ning S, Laird D, Cherrington JM, Knox SJ. The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. Radiat Res 2002; 157: 45-51.
4. Shemirani B, Crowe DL. Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. Oral Oncol 2000; 36:61-66.
5. Strieth S, Hartschuh W, Pilz L, Fusenig NE. Angiogenic switch occurs late in squamous cell carcinomas of human skin. Br J Cancer 2000; 82:591-600.
6. Ozalp S, Y-alcin OT, Oner U, et al. Microvessel density as a prognostic factor in preinvasive and invasive cervical lesions. Eur J Gynaecol Oncol 2003; 24:425-28.

7. Weidner N, Semple IP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8.
8. Craft PS, Harris AL. Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis. *Ann Oncol* 1994; 5:305-11.
9. Weiqner N., Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147:9-19.
10. Foss AJ, Alexander RA, Lefferies LW, et al. Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res* 1996; 56:2900-03.
11. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 585-89.
12. Lenczewski A, Terlikowski SJ, Sulkowska M, et al. Prognostic significance of CD34 expression in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40:205-06.
13. Hannen FJ, van der Laak JA, Manni JJ, et al. Improved prediction of metastasis in tongue carcinomas, combining vascular and nuclear tumor parameters. *Cancer* 2001; 92: 1881-87.
14. Hagedorn HG, Nerlich AG. Microvessel density and endothelial basement membrane composition in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2000; 120:891-98.
15. Stanton AW, Drysdale SB, Patel R, et al. Expansion of microvascular bed and increased solute flux in human basal cell carcinoma *in vivo*, measured by fluorescein video angiography. *Cancer Res* 2003; 3:396-99.
16. Bedlow AJ, Stanton AW, Cliff S, Mortimer PS. Basal cell carcinoma an *in vivo* model of human tumor microcirculation. *Exp Dermatol* 1999; 8:222-26.
17. Weninger W, Rendl M, Pammer J, et al. Differences in tumor microvessel density between squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas may relate to their different biologic behavior. *J Cutan Pathol* 1997; 24:364-69.
18. Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 2004; 151: 837-45.
19. Rasi A, Safaie Naraghi Z, Tavanger SM, et al. CD31- specific immunohistochemical staining for angiogenesis – A study of basal and squamous cell skin carcinoma and its correlation with invasive growth pattern. *J IR Medic Sciences* 2006; 49: 63-70.
20. Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001; 20:672-82.
21. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Invading edge vs. inner (edvin) patterns of vascularization: an interplay between angiogenic and vascular survival factors defines the clinical behaviour of non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2000; 92: 140-49.
22. Stabino S, Boscaino A, Salvatore G, et al. The prognostic significance of tumor angiogenesis nonaggressive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol* 1996; 27: 695-700.