

ارتباط بین تراکم ماست سلها و ریز عروق خونی با stage و grade بیماران مبتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

دکتر محمود سینا^۱، دکتر خدیجه ابدال^۲، دکتر سینا قرطاسی^۳، دکتر مصطفی محمودی^۴، دکتر امیرعلا آغبالی^۵ #

۱- استادیار، گروه آسیب شناسی دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

۲- استادیار، گروه آسیب شناسی دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران

۳- دندانپزشک

۴- استادیار، گروه آسیب شناسی دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، ایران

۵- دانشیار گروه آسیب شناسی دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

خلاصه:

سابقه و هدف: کارسینوم سلول سنگفرشی، شایع ترین بدخیمی حفره دهان می باشد که Grade و stage مهمترین عوامل تعیین کننده پیش آگهی در این تومور می باشند. ماست سلها از طریق آنژیوژنز در پیشرفت تومور نقش بسزایی دارند. هدف از انجام این مطالعه ارتباط تراکم ماست سلها و ریز عروق خونی با stage و grade در بیماران کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

مواد و روش ها: این مطالعه از نوع توصیفی بود که میزان ماست سل ها و میزان ریز عروق خونی در ۸۷ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. رنگ آمیزی ماست سل ها و ریز عروق خونی به روش ایمونوهیستوشیمی انجام گرفت. داده های بدست آمده از مطالعه بوسیله روشهای آماری توصیفی و آزمون ANOVA و ضریب همبستگی اسپیرمن و به کمک نرم افزار آماری SPSS/16 مورد تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته ها: میزان تراکم ماست سلها در اطراف تومور $60.07 \pm 15/18$ و در داخل تومور $51/84 \pm 10/63$ بود و میزان ریز عروق خونی در اطراف تومور $46/79 \pm 9/61$ و در داخل تومور $41/45 \pm 7/62$ بود. بین میزان ماست سل با میزان ریز عروق خونی همبستگی وجود داشت. ($r=0/77$) میزان ماست سل و ریز عروق خونی رابطه مثبتی با Grade و Stage داشتند. میزان ماست سل و ریز عروق خونی، پیش بینی کننده متاستاز به غدد لنفاوی گردن بود. ($P < 0/05$)

نتیجه گیری: به نظر می رسد تراکم ماست سل ها و ریز عروق خونی میتواند به عنوان یک عامل تعیین کننده grade و متاستاز لنف نودهای گردنی در اسکواموس سل کارسینوماهای دهان مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کارسینوم سلول سنگفرشی، ماست سل، ریز عروق خونی، پیش آگهی، سرطان دهان

وصول مقاله: ۹۴/۲/۶ اصلاح نهایی: ۹۴/۹/۷ پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۲۷

مقدمه:

همانطور که در شرایط فیزیولوژیک در بافت رخ می دهد در رشد و گسترش سلولهای تومورال و سرطانی نقش بسیار مهمی ایفا می کند. تومورها رشد عروق خونی میزبان را تحریک می کنند که به آن آنژیوژنز گفته میشود که برای رشد مداوم تومور و متاستاز لازم است.^(۴،۵) عوامل آنژیوژنز وابسته به تومور، یا به واسطه سلولهای تومور تولید می شود یا ممکن است از سلولهای التهابی که در تومور پخش شده اند منشا بگیرند. واکنش بین سلولهای تومور و سلولهای سیستم دفاعی بدن و میزان ریز

اسکواموس سل کارسینوما شایعترین بدخیمی حفره دهان به شمار می رود.^(۱) علیرغم پیشرفتهایی که در روشهای شناسایی این تومور انجام شده بقای ۵ ساله این بیماران بسیار کم است^(۲،۳) تعیین stage و grade مهمترین عوامل دخیل در پیش آگهی و درمان SCC هستند، اما از آنجایی که این تومور رفتارهای بیولوژیکی متغیری را نشان می دهد، حتی گاهی با توجه به نمای هیستوپاتولوژیک و stage بیماری پروگنوز آن قابل پیش بینی نیست. تشکیل عروق خونی

شد.^(۱۶) نمونه‌های مورد مطالعه از بیمارانی که در سالهای ۱۳۸۶ تا ۱۳۹۰ در انستیتو کانسر، تحت جراحی به علت ابتلا به کارسینوم سلول سنگفرشی حفره دهان قرار گرفتند و به طور همزمان تحت درمان بیماری دیگری (آلرژی، عفونت و ...) نبودند انتخاب شدند. بیمارانی که اطلاعات بالینی آنها در پرونده ناقص بود و نمونه‌هایی که دارای میزان کافی از ضایعه به منظور رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بودند و بیمارانی که تحت "Ultraviolet Radiation" بودند از مطالعه حذف شدند. برای مشخص شدن Grade تومور، از بلوکهای پارافینی موجود در آرشیو بخش پاتولوژی برش ۵ میکرومتری تهیه شده و به روش معمول هماتوکسیلین-ائوزینوفیل رنگ آمیزی شد سپس با میکروسکوپ نوری توسط ۲ پاتولوژیست براساس معیارهای کتاب مرجع مورد ارزیابی قرار گرفت.^(۱۵) بررسی میزان تراکم ماست سلها از روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از:

anti mast cell tryptase primary monoclonal antibody

(;code;M7052 (Dako,GlostrupDanmark) انجام شد.^(۱۳)

اسلایدهای رنگ آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی $400\times$ تحت مطالعه قرار گرفت. با استفاده از مقایسه با نمونه شاهد مثبت (بافت لوزه انسان) از صحت رنگ آمیزی ماست سلها اطمینان حاصل شد.

تعداد ماست سلها با استفاده از نشانگر تریپتاز (tryptase) در استرومای تومور که واحد بیشترین رنگ پذیری بودند به صورت (hot Spot) ارزیابی شدند. ارزیابی در ۵ نقطه در اطراف تومور (استرومای مجاور اپیتلیوم) و نیز در ۵ نقطه در داخل تومور (نواحی عمقی تر تومور) به صورت جداگانه انجام شد.^(۱۶)

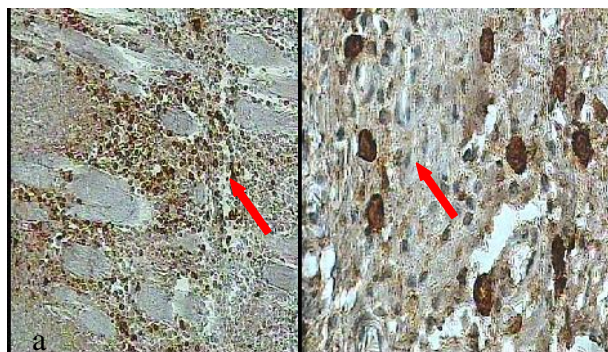
با استفاده از مقایسه با نمونه شاهد مثبت (همانژیوم) از صحت رنگ آمیزی اطمینان حاصل گردید.^(۱۳)

اسلایدهای رنگ آمیزی شده زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی $400\times$ برابر تحت مطالعه قرار گرفت. تعداد عروق خونی با استفاده از نشانگر CD34 در استرومای تومور که واجد بیشترین رنگ پذیری بود ارزیابی شد.

عروق خونی می‌تواند رفتار بیولوژیکی تومور را تحت تاثیر قرار دهد و از این ارتباط می‌توان به عنوان عاملی برای پیشگویی شرایط و تعیین وضعیت بیمار استفاده کرد. در میان سلولهای دفاعی بدن نقش ماست سلها به عنوان نوعی عامل پیشگویی کننده و تحریک کننده آنژیوژنز مطرح شده است.^(۶،۷) رفتارهای متفاوتی از این سلول در تومورهای مختلف گزارش شده است. توانایی تولید سایتوکاینهای مختلف این تفاوت رفتاری "ماست سلها" را تا حدودی توجیه می‌کند. ماست سلها سایتوکاینهای متعدد مرتبط باتومورها نظیر سرین پروتئازهای تریپتاز و کیماز، TNF, NGF, TGF- β , IL8, اترشح میکنند. فاکتورهای VEGF و FGF-2، سبب رشد تومور به وسیله گسترش ذخایر خونی و آنژیوژنز به واسطه ماتریکس خارج سلولی می‌شوند.^(۸) حضور "ماست سلها" گاهی موجب مقاومت در برابر تومور و یا بالعکس تحریک فعالیت تکثیری در تومورها می‌شود.^(۹) در سرطانهای پروستات، لنفوم و دستگاه گوارش افزایش تراکم ماست سلها با نتایج درمانی ضعیف همراه بوده است.^(۱۰-۱۲) اما در بعضی مطالعات به نقش محافظتی ماست سلها در سرطان اشاره شده است.^(۱۳) در یک مطالعه آزمایشگاهی مشخص شد که ماست سلها اثر بازدارندگی روی تکثیر سلولهای SCC مخاط دهان را دارند^(۱۴)، در حالیکه در مطالعه حیوانی انجام شده دیگر، فعالیت ماست سلها همراه با افزایش تکثیر سلولهای تومورال حفره دهان بوده است.^(۱۴) با توجه به اینکه فرآیند آنژیوژنز در سرطانها، تعیین کننده رفتار تومور و بیانگر بروز متاستاز به غدد لنفاوی می‌باشد.^(۱۵) به نظر می‌رسد بتوان با در نظر گرفتن حضور ماست سلها و مطالعه عملکرد آنها در تشکیل ریز عروق خونی در داخل و اطراف تومور، متاستازهای لنفاوی و stage و grade تومور را بررسی کرد.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی بیماران مبتلا به SCC دهان که تحت درمان جراحی قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفتند. حجم نمونه براساس مطالعه محتشم و همکاران با استفاده از نرم افزار medcalc محاسبه گردید که ۸۷ نمونه برآورده



شکل ۲- مثبت شدن آنتی بادی تریپتاز ماست سل در SCC, با بزرگنمایی (a) $\times 200$ و (b) $\times 400$ میزان ماست سل ها در تومورهای با درجه تمایز بافتی مختلف، تفاوت معنی داری داشت. ($P < 0.001$) جدول (۱)

جدول ۱- میزان تراکم ماست سل و ریز عروق خونی بر اساس گریب هیستوپاتولوژی

Grade درجه هیستوپاتولوژی	تراکم ماست سل		تراکم ریز عروق خونی	
	اطراف تومور	داخل تومور	اطراف تومور	داخل تومور
Grade I	$51/24 \pm 10/79$	$49/39 \pm 7/30$	$42/14 \pm 8/08$	$37/45 \pm 5/64$
Grade II	$65/44 \pm 8/77$	$57/91 \pm 9/81$	$51/15 \pm 8/74$	$45/03 \pm 7/25$
Grade III	$70/06 \pm 14/69$	$60/44 \pm 7/90$	$53/11 \pm 9/08$	$47/44 \pm 7/35$

میزان ریز عروق خونی در تومورهای با درجه تمایز بافتی مختلف، تفاوت معنی داری داشت. ($P < 0.001$) جدول (۲)

جدول ۲- میزان تراکم ماست سل و ریز عروق خونی بر اساس مرحله کلینیکی (Stage)

(مرحله کلینیکی) Stage	تراکم ماست سل		تراکم ریز عروق خونی	
	اطراف تومور	داخل تومور	اطراف تومور	داخل تومور
Stage I	$53/21 \pm 10/22$	$45/71 \pm 8/05$	$41/93 \pm 8/37$	$36/79 \pm 5/43$
Stage II	$53/97 \pm 11/77$	$46/17 \pm 7/89$	$43/93 \pm 6/36$	$37/50 \pm 5/21$
Stage III	$61/96 \pm 17/38$	$55/17 \pm 11/38$	$48/13 \pm 9/09$	$43/09 \pm 7/34$
Stage IV	$71 \pm 13/42$	$60/10 \pm 7/55$	$55/29 \pm 7/32$	$48/71 \pm 5/54$

میزان ماست سل ها و ریز عروق خونی در تومورهای مربوط به بیماران دارای متاستاز به غدد لنفاوی گردن و بیماران بدون

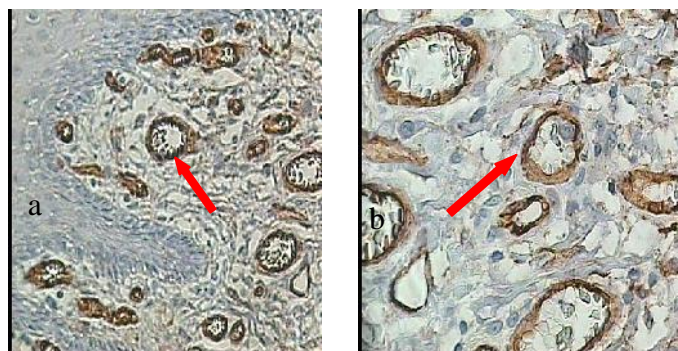
ارزیابی در ۵ نقطه در اطراف تومور (استرومای مجاور اپیتلیوم) و نیز در در ۵ نقطه در داخل تومور (نواحی عمقی تر تومور) به صورت جداگانه انجام شد. (۱۶)

بین تراکم ماست سل ها و ریز عروق خونی با Grade و Stage ضریب همبستگی پیرسون گرفته شد و نیز آزمون T بین دو گروه انجام شد.

یافته ها:

در این مطالعه ۸۷ بیمار مبتلا به سرطان دهان با میانگین سنی $56/74 \pm 17/61$ سال (در محدوده ۲۱ تا ۸۶ سال) مورد بررسی قرار گرفتند. ۵۱ نفر (۵۸/۶٪) مرد بوده و زنان (۴۱/۴۵٪) شایعترین محل ابتلا بود.

میزان تراکم ماست سلها در اطراف تومور $60/07 \pm 15/18$ و در داخل تومور $51/84 \pm 10/63$ بود و میزان ریز عروق خونی در اطراف تومور $46/79 \pm 9/61$ و در داخل تومور $41/45 \pm 7/62$ بود. شکل (۱ و ۲)



شکل ۱- مثبت شدن آنتی بادی CD34 ریز عروق خونی در SCC, با بزرگنمایی (a) $\times 100$ و (b) $\times 200$

نتایج آزمون ضریب همبستگی اسپیرمن نشان داد که همبستگی آماری معنی داری بین میزان ماست سلها و میزان ریز عروق خونی در اطراف تومور وجود داشت. ($p < 0.001$) , ($r_s = 0.77$)

سل ها میتواند به عنوان یک هدف درمانی جدید برای درمان سرطانها و رشد تومور مطرح شود که نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر از لحاظ تراکم ماست سل در رشد و پیشرفت تومور مشابه است.^(۱۹) در مطالعه Sharma و همکاران نیز، همبستگی بین میزان ماست سل و ریز عروق خونی، وجود داشت.^(۲۰)

در تحقیقی که توسط Anuradha و همکارانش انجام شد نتایج مطالعه نشان داد که رابطه مثبتی بین افزایش تعداد تراکم ماست سل و پیشرفت تومور وجود داشت که نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر از لحاظ بررسی ضایعات بدخیم همخوانی دارد.^(۲۱)

در این مطالعه بین میزان ماست سل و grade تومور، رابطه مثبتی وجود داشت به طوری که تومورهای با تمایز ضعیف تر دارای ماست سل بیشتری از تومورهای تمایز یافته داشتند. که مشابه مطالعه Sharma و همکاران می باشد.^(۲۰)

در مطالعه‌ای دیگر، با افزایش grade، میزان ماست سل، کاهش یافته است که متفاوت با مطالعه حاضر می باشد. البته در آن مطالعه برای مشاهده ماست سل ها، از رنگ آمیزی تولوئیدین بلو استفاده شده است.^(۲۱)

نتایج چند مطالعه دیگر نشان داد که تراکم ماست سل ها نقش مهمی در پیشرفت تومور دارد که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر مشابه است.^(۲۱-۲۴)

در این مطالعه رابطه مثبتی بین grade و میزان ریز عروق خونی وجود داشت که مشابه سایر مطالعات است.^(۱۹،۲۱)

در مطالعه Astekar و همکاران، با افزایش grade، میزان ریز عروق خونی کاهش نشان داد که با نتیجه مطالعه ما، متفاوت است که این تفاوت میتواند به علت حجم نمونه کم مطالعه Astekar باشد.^(۲۵)

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان ماست سلها و ریز عروق خونی در داخل و اطراف تومور در مراحل مختلف بالینی بیمار متفاوت است. که مشابه سایر مطالعات است.^(۲۶-۲۹)

متاستاز به غدد لنفاوی مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان ماست سل و نیز میزان ریز عروق خونی در داخل و خارج تومور در نمونه های دارای متاستاز به غدد لنفاوی به طور معنی داری بیشتر از نمونه های بدون متاستاز به غدد لنفاوی گردن است. ($P < 0.05$). جدول (۳)

جدول ۳- میزان تراکم ماست سل و ریز عروق خونی بر اساس متاستاز به لنف نود

متاستاز به لنف نود	تراکم ماست سل		تراکم ریز عروق خونی	
	اطراف تومور	داخل تومور	اطراف تومور	داخل تومور
(منفی) Negative	۵۳±۱۰/۴۷	۴۶/۱۱±۷/۶۶	۴۲/۴۷±۷/۷۲	۳۷/۶۵±۴/۵۴
(مثبت) Positive	۷۲/۲۲±۱۴/۳۹	۶۱/۶۹±۷/۲۸	۵۴/۲۲±۷/۹۱	۴۷/۹۷±۶/۱۸

بحث:

تراکم ریز عروق خونی (Microvascular density) در رشد و گسترش سلولهای تومورال، قابلیت و یا متاستاز آنها نقش بسیار مهمی ایفا می کند.^(۴،۵) در مطالعه حاضر، همبستگی بین میزان ماست سلها و میزان ریز عروق خونی وجود دارد. مطالعات اخیر در تومورهای توپر بدخیم نشان داده اند که ماست سلها ممکن است نقشی در آنژیوژنز تومور داشته باشند و احتمالاً تعداد ماست سلها یک نشانه پیشگویی کننده می باشد.^(۶،۷،۱۸) چندین عامل آنژیوژنیک از جمله VEGF در ماست سلها شناخته شده است، تریپتاز موجود در ماست سلها، نیز ممکن است یک فاکتور آنژیوژنیک باشد.^(۸)

مطالعه جعفری و همکاران نشان داده بود که میزان ماست سلها در اطراف تومور و داخل تومور متفاوت است به همین دلیل در این مطالعه میزان ماست سلها به صورت جداگانه در اطراف تومور (استرومای زیر اپیکیوم) و داخل تومور (نواحی عمقی تر و تهاجمی تومور) شمارش گردید.^(۱۷)

در مطالعه ای که توسط Zaidi و همکاران صورت گرفت نتایج مطالعه نشان داد نقش ماست سلها در تومورها ارتباط مستقیم با پیامدهای بالینی بیماران دارد و مهار کردن ماست

References:

- Vieira FL, Vieira BJ, Guimaraes MA, Aarestrup FM. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa : Correlation with the expression of ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health* 2008;8:25.
- Sharma B, Srivam G, Saraswathi TR, Sirapathasundharam B. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res* 2010;21(2):260-5
- Kalra M, Rao N, Narda K, Rehman F, Girish KL, Tippu S, et al. The role of mast cells on angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* ,2012;17(2): 190-6.
- Manpert K, Nirmala Rao, Kanwardeep Nanda, Farzan Rehman, KL. Girish. The role of mast cells on angiogenesis in oral squamous cell carcinoma . *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012 ;17(2): 190-6.
- Sharma B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma . *Indian J Dent Res* 2010 ;21(2):260-5.
- Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Sekiya R,etal. Association of mast cells with tumor angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2001; 14(2): 135-8.
- Jahanshahi G, Sabaghian M . Comparative immunohistochemical analysis of angiogenesis and mast cell density in oral normal mucosa and squamous cell carcinoma. *Dent Res J (Isfahan)* 2012; 9(1):8-12
- Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tete S, et al. Role of mast cell in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci* 2007;37(4):315-22.
- Liu J, Zhang Y, Zho J, Yang Z, Li D, Katirai F, et al. Mast cell: insight into remodeling a tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30(2):177-84.
- Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(7):1265-75
- Taskinen M, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S. Prognostic influence of tumor infiltrating mast cells in patients with follicular lymphoma treated with rituximab and CHOP. *Blood* 2008;111(9):4664-7.
- Fleischmann A, Schlomm T, Kollerermann J, Sekulic N, Huland H, Mirlacher M et al. Immunological microenvironment in prostate cancer. High mast cell densities are associated with favorable tumor characteristic and good prognosis. *The prostate* , 2009; 69:976-81.
- Ch'ng S, Sullivan M, Yuan L, Davis P, Tan ST. Mast cells dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma . *Cancer Cell Int* 2006 19;6:28.
- Aromando RF, Perez MA, Heber EM, Trivillin VA, Tomasi VH, SchwintAE, et al. Potential role of mast cells in hamster cheek pouch carcinogenesis. *Oral Oncol* 2008; 44(11):1080-7.

نتایج مربوط به میزان ماست سل و ریز عروق خونی در تومورهای دارای متاستاز به لنف نود و تومورهای بدون متاستاز نشان داد که تفاوت معنی داری بین میزان ماست سل و ریز عروق خونی در این دو گروه وجود دارد به طوریکه میزان ماست سل می تواند به عنوان یک عامل پیش بینی کننده برای متاستاز به غدد لنفاوی مورد استفاده قرار گیرد. Souza و همکاران نیز عنوان داشته اند که میزان ریز عروق خونی میتواند پیش بینی کننده متاستاز به غدد لنفاوی در SCC لب باشد که مشابه مطالعه ما میباشد^(۲۶). Sugiura و همکاران نشان دادند که میزان تراکم عروق لنفاوی میتواند پیش بینی کننده متاستاز به غدد لنفاوی گردن در مبتلایان به SCC دهان باشد.^(۲۷)

نتیجه گیری:

به نظر می رسد ماست سل ها باعث تحریک رگ سازی در SCC دهان شده و در پیشرفت این تومور نقش داشته باشند.

15. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial pathology. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Inc; 2009:P: 409-18.
16. Mohtasham N, Babakoochi S, Salehinejad J, Montaser-Kouhsari L, Shakeri MT, Shojaei S, et al. Mast cell density and angiogenesis in oral dysplastic epithelium and low and high grade oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand* 2010;68(5):300-4
17. Jaafari Z, Ashkavandi M, Moshref F, Mashhadi Abbas S, Sargolzaie N, Taghavi. Evaluation of CD31 Expression and Mast cell count in Dysplastic lesions and Squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2010; 12(3):272-6.
18. Iamaroon A1, Pongsiriwet S, Jittidecharaks S, Pattanaporn K, Prapayasatok S, Wanachantararak S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32(4):195-9.
19. Zaidi M, Malik A. A Study on Assessment of Mast Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Ann Med Health Sci Res* 2014 ; 4(3): 457-60.
20. Sharma B, Sriram G, Sarasswathi TR, Sivapathasunaharam B. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res* 2010;21(2):260-5.
21. Anuradha A, Kiran Kumar Naik B, Vijay Srinivas G, Devi RS, Puneet HK. Incidence of Mast Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma: A Short Study. *J Oncol* 2014;2014:614291
22. Elezo lu B, Tolunay S. The relationship between the stromal mast cell number, microvessel density, c-erbB-2 staining and survival and prognostic factors in colorectal carcinoma. *Turk Patoloji Derg* 2012;28(2):110-8.
23. Kim JH, Kang YJ, Kim DS, Lee CH, Jeon YS, Lee NK, et al. The relationship between mast cell density and tumour grade in transitional cell carcinoma of the bladder. *J Int Med Res* 2011;39(5):1675-81.
24. Dastpak M, Nafarzadeh S, Khafri S. A comparative study on the mast cells count in oral squamous cell carcinoma and normal oral mucosa. *Caspian J Dent Res* 2015; 4(2): 17-22.
25. Astekar M, Joshi A, Ramesh G, Metgud R. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012;16(1):22-6
26. Souza LR, Fonseca-Silva T, Santos CC, Oliveira MV, Corrêa-Oliveira R, Guimarães AL, et al. Association of mast cell, eosinophil leucocyte and microvessel densities in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Histopathology*, 2010 ;57(6):796-805.
27. Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, et al. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol* 2009 ;34(3):673-80.
28. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006 ;107(3):563-9.
29. Gandour-Edwards R, Trock B, Donald PJ. Predictive value of cathepsin-D for cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1999 ;21(8):718-22.