

مجله دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

سال ۶۲، شماره ۴، صفحات ۳۴۰ تا ۳۴۴، (۱۳۸۳)

## بررسی میزان آنژیوژنیز در مغز استخوان بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی قبل و بعد از درمان بیمارستان شریعتی، ۸۲-۱۳۸۱

دکتر زهره صنعت (فوق تخصص)\*، دکتر سیدمحمد توانگر (استادیار)\*، دکتر احمد شریف تبریزی (پزشک عمومی)\*\*، دکتر کامران علی مقدم (استادیار)\*، دکتر اردشیر قوامزاده (استاد)\*، دکتر محمد جهانی (دانشیار)\*  
\* بخش خون و انکولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران  
\*\* مرکز تحقیقات خون، بیمارستان شریعتی

### چکیده

**مقدمه:** بوجود آمدن عروق خونی جدید یکی از علل مهم در رشد سلولهای بد خیم میباشد. عوامل موثر در تولید عروق خونی جدید از ساولهای بدخیم و ما کروفاژها و ماست سلها و سلولهای لنفوسیت آزاد می شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی عروق خونی جدید در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی که تحت درمان قرار گرفته اند می باشد.

**مواد و روشها:** بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی قبل و در طول در مان و در انتهای در مان تحت بیوپسی مغز استخوان قرار می گیرند و سپس با رنگ آمیزی اختصاصی فاکتور VIII میزان تغییر در عروق خونی مغز استخوان بررسی می شود. بعد از جمع آوری آنالیز تصویری میانگین چگالی عروق نمونه ها قبل از درمان و بعد از درمان مقایسه گردیدند.

**یافته ها:** میانگین (Micro vascular density)MVD قبل از درمان در بیماران APL  $3/58 \pm 6/81\%$  بود. این میانگین بعد از خاتمه درمان به  $3/06 \pm 3/48\%$  می رسید ( $P < 0/0001$ ). در بیماران غیر APL میانگین MVD قبل از درمان  $3/38$  و میانگین MVD بعد از درمان  $3/6$  بود که تفاوت معنی داری بین این دو گروه وجود نداشت.

**نتیجه گیری و توصیه ها:** به نظر می رسد میزان آنژیوژنز در بیماران APL در شروع درمان بالاتر از حد طبیعی است این میزان با درمان آرسنیک کاهش می یابد داروهای متداول شیمی درمانی قادر به کاهش آنژیوژنز در بیماران غیر APL نبوده اند اثر ضد رگزایی داروهای شیمی درمانی در بیماران لوسمی در صورتی قابل توجه خواهد بود که تاثیر بر روی زنده بودن سلولهای آ ندوتلیوم وجود داشته باشد در صورتی که صرفاً دارو از طریق کاهش تعداد بلاست عمل کند، ممکن است کاهش رگزایی در مغز استخوان مشاهده نگردد.

## مقدمه

نمونه‌های مغز استخوان ۷۰ بیمار AML که در بیمارستان شریعتی در مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بستری شده بودند سال ۱۳۸۱-۱۳۸۲ و تحت درمان با آرسنیک تری اکسید (۱۰ میلی گرم در ۵۰۰ میلی لیتر ۵% DW در عرض ۲-۳ ساعت) و یا رژیم ۳×۷ (سیتارابین ۱۰۰ میلی گرم بر متر مربع بدن و دانوروبیسین ۴۵ میلی گرم بر متر مربع بدن) قرار گرفته بودند مورد بررسی قرار گرفتند و به رمسیون کامل رفته بودند، اسلاید تهیه شده و مطابق روش زیر رنگ آمیزی گردید. با توجه به اینکه در انجام ایمونوهیستوشیمی نیاز به نمونه‌های حجیم از مغز استخوان بوده نهایتاً ۳۰ بیمار که نمونه‌های قبل و بعد از درمان آنها قابل بررسی بودند انتخاب گردیدند و ایمونوهیستوشیمی بر روی آنها انجام گرفت. از این تعداد ۱۷ بیمار AML (M3) و ۱۳ بیمار انواع دیگر AML بودند.

### روش انجام ایمونو هیستوشیمی

بافت به قسمتهای ۳ میکرومتری تقسیم می‌شود و بر روی لام قرار می‌گیرند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۶ درجه انکوبه می‌گردند. مقاطع با قراردادن در محلول‌های بصورت سریال رقیق شده اتانول و گزلبول واحدی که به آب مقطر برسد، dewaxed و dehydrate می‌گردد. سپس تحت تاثیر پروتئاز و تریپسین قرار گرفته و با رقت ۱/۶۰۰ آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی فاکتور VWF رنگ آمیزی می‌گردد (به مدت ۹۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار می‌گیرد) و نهایتاً بعد از واکنش ایمونو پراکسیداز با همتاکسیلین counter stain می‌شود. سپس سه قسمت سلولی انتخاب شده و با لنز X20 توسط میکروسکوپ متصل به کامپیوتر بررسی می‌شدند. مقادیر دیژیتالیزه شده و ناحیه عروقی با استفاده از Image analysis system مشخص شده و بدین ترتیب تحلیل می‌گردد، که Pixel های تصویری عروقی به کل Pixel ها به عنوان درصد واسکولاریته بیان می‌گردد. این کار برای هر سه منطقه تکرار می‌شود و در صورتی لومن عروقی شمرده می‌شود که با رنگ آمیزی VWF رنگ گرفته باشد نمونه های BMB بیماران قبل از شروع درمان و بعد از حصول رمسیون تهیه گردیده بودند. (تعدادی از نمونه‌های روزهای

آنژیوزنزیس یا بوجود آمدن عروق خونی جدید علت مهمی جهت رشد و زنده ماندن سلولهای نومورال می‌باشد (۱). عواملی که باعث آنژیوزنزیس می‌شوند از سلولهای نومورال و یا سلولهای بافتهای اطراف مانند ماکروفاژ و لنفوسیت‌ها آزاد می‌گردند. در واقع عوامل آزاد شده از این سلولها باعث افزایش رشد سلولهای آندوتلیال جدار عروق می‌شوند (۲،۳،۴). آنژیوزنزیس نقش مهمی در پیشرفت و بروز متاستاز در نومورهای بافت نرم دارد (۵) هم چنین وجود آنژیوزنزیس در گروهی از بیماری‌های خونی بدخیم از جمله مولتی پل میلوم دیده شده است که این افزایش عروق خونی همراه با فعال بودن بیماری است (۶-۷). در لنفوم نان هوچکین B-CELL وجود آنژیوزنزیس با stage بیماری ارتباط داشته است (۸). مشاهده شده است که در انواع لوسمی‌های حاد دانسیته واسکولار مغز استخوان افزایش می‌یابد (۹). همچنین به نظر می‌رسد که بعد از درمان دانسیته عروق مغز استخوان کم شده و یکی از فاکتورهای پروگنوستیک در سرنوشته لوسمی حاد میلوئیدی (Acute myloid leukemia) میزان افزایش عروق ریز مغز استخوان می‌باشد. داروی آرسنیک تری اکسید یکی از داروهای جدید و موثر در درمان بیماران مبتلا به لوسمی حاد پرومیلوسیتیک (Acute promyelocytic leukemia) می‌باشد (۱۳). ولی در عین حال داروهای دیگر شیمی درمانی اثر اختصاصی بر روی آندوتلیوم عروق ندارند بلکه کاهش چگالی عروقی مغز استخوان بعد از درمان با آنها به دلیل کاهش تعداد سلولهای لوسمی در مغز استخوان و در نتیجه کاهش ترشح مواد بیولوژیک تحریک کننده رشد عروق از سلولهای لوسمی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان آنژیوزنزیس در مغز استخوان بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی قبل و بعد از درمان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

رانشان دادن برابر ۵۷/۲ ± ۴/۳٪ بود ( حداقل ۱٪ و حداکثر ۱۰/۶٪). مشاهده شد که در بیماران APL با محاسبه همبستگی داده‌ها مقادیر قبل و بعد از درمان با  $R=0/612$  و  $P=0/02$  با یکدیگر ارتباط داشتند. یعنی مقادیر قبل از درمان هرچه بالاتر بود میزان کاهش MVD یکسان بوده و میزان MVD بعد از خاتمه درمان متناسب با آن بالاتر بود یا به عبارت دیگر درصد کاهش MVD با درمان یکسان بوده و MVD نهائی متناسب با MVD اولیه قبل از درمان بود. در بیماران غیر APL میانگین MVD قبل از درمان ۳/۳۸ و میانگین MVD بعد از درمان ۳/۶ بود که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود نداشت.

هیچگونه ارتباط معنی‌داری در هر دو گروه از بیماران بین چگالی عروقی مغز استخوان و تعداد بلاست مغز استخوان و نیز سلولاریتی مغز استخوان وجود نداشت.

## بحث

در مطالعات مختلف نقش آنژیوزنز در تومورهای مختلف نشان داده شده است. در مورد بدخیمی‌های خونی نقش آنژیوزنز MVD در بیماریهائی مثل مولتیپل میلوم و لنفوم‌های B-Cell بیان شده است. همچنین مطالعات انجام شده نشان دهنده افزایش MVD در لوسمی‌ها نسبت به گروه کنترل بود و همچنین مشاهده شده که کموتراپی و حصول ریمیسیون کامل سبب کاهش MVD به سطح نرمال می‌گردد (۹، ۱۰، ۱۱).

به نظر می‌رسد که علت افزایش MVD در لوسمی‌ها ترشح فاکتورهای آنژیوزنزیس از سلولهای لوسمیک بوده که ترشح آنها سبب ایجاد عروق جدید در مغز استخوان شد و با کاهش تعداد سلولهای بلاست این میزان به حد نرمال می‌سد. در مطالعه ما نشان داده شد که میزان آنژیوزنز در بیماران AML-M3 در شروع درمان بالاتر از حد طبیعی است و این میزان با درمان با آرسنیک کاهش می‌یابد که می‌تواند به علت خواص آنتی لوسمیک دارو باشد یعنی کاهش سلولهای نارس سبب کاهش آنژیوزنز گردد. اما مطالعه

۱۰ و ۲۰ نیز مطالعه گردید که باتوجه به اینکه تنها از نظر آماری تغییر قابل توجهی بین نمونه‌های روزهای صفر و روز حصول ریمیسیون بطور متوسط روز ۳۰ قابل مشاهده بود، لذا تنها این نمونه‌ها بررسی شدند). از این ۳۰ نمونه مربوط به بیماران، بعد از رنگ‌آمیزی عکس گرفته شد. تصاویر مربوطه digitalize شده و سپس توسط دو نرم افزار Image tool و Image J مربوط به NIH آنالیز گردید. روش آنالیز به این ترتیب بود که ابتدا سه نقطه Hot spot (مناطق که بیشترین تعداد رگ را داشتند) بر روی هر لام انتخاب شدند. سپس مساحت عروق بر روی هر field محاسبه شده و سپس میانگین این سه منطقه انتخاب شده و بر روی هر لام محاسبه گردید. عدد نهائی به میزان چگالی عروقی هر نمونه در نظر گرفته شد. همچنین در صد cellularity مغز استخوان و نیز تعداد بلاست‌ها از گزارشات پاتولوژی استخراج گردیده و ارتباط آنها با چگالی عروقی مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه نتایج میانگین چگالی عروقی قبل و بعد از درمان توسط آزمون t-test با یکدیگر مقایسه گردیدند.

## یافته‌ها

در این طرح تعداد ۱۲ بیمار زن و ۱۸ بیمار مرد مورد مطالعه قرار گرفتند. ۱۳ بیمار AML و ۱۷ بیمار APL بودند. در کلیه بیماران APL بررسی سیتوژنتیک (15;17)t مثبت گزارش شده است. در گروه AML (16) inv (9;22)t (1;3) del (9) del (6;9) del (1;9) است. بعد از جمع‌آوری آنالیز تصویری میانگین چگالی عروق (MVD), vascular density (Micro) نمونه‌ها قبل از درمان و بعد از درمان مقایسه گردیدند. میانگین چگالی عروق قبل از درمان در بیماران APL  $3/58 \pm 6/81$ ٪ بود. این میانگین بعد از خاتمه درمان به  $3/06 \pm 3/48$ ٪ می‌رسید ( $P < 0/0001$ ) از طرفی در تمامی بیماران به جز دو بیمار کاهش MVD قبل و بعد از درمان قابل مشاهده بود (در ۸۵٪ بیماران کاهش MVD نسبت به قبل از درمان مشاهده شد). همچنین میانگین کاهش میزان MVD در بیمارانی که کاهش MVD

اینکه داروهای متداول شیمی درمانی قادر به کاهش آنژیوژنز در بیماران غیر APL نبوده‌اند را بدین ترتیب میتوان توجیه نمود که اثر ضد رگزایی داروهای شیمی درمانی در بیماران لوسمی در صورتی قابل توجه خواهد بود که تاثیر بر روی زنده بودن سلولهای آندوتلیوم وجود داشته باشد و در صورتی که صرفاً دارو از طریق کاهش تعداد بلاست عمل کند، ممکن است کاهش رگزایی در مغز استخوان مشاهده نگردد.

ما همچنین نشان دادیم که میزان کاهش MVD متعاقب درمان با آرسنیک متناسب است با میزان اولیه MVD. لذا محتمل به نظر می‌رسد که اثر آنتی آنژیوژنز آرسنیک در ایجاد پاسخ موثر باشد چون اگر قرار بود که کاهش آنژیوژنز در بیماران که به رمیسیون کامل رسیده‌اند ناشی از خواص آنتی لوسمیک دارو باشد می‌باید همه بیماران به سطح ثابتی از MVD می‌رسیدند ولی اینکه میزان کاهش بایک ضریب همبستگی ثابت با میزان اولیه آنژیوژنز ارتباط دارد بیشتر مؤید خواص آنتی آنژیوژن‌دارو برای کاهش MVD می‌باشد.

## منابع

1. Folkman J, Watson k, Ingber D, Hanahan D .Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasm.Nature,1989:339-58.
2. Nicosia RF,Tchao R, Leighton J .Interaction between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture.Clin Exp Metastasis.1986;4:91.
3. Hamad J ,Cavanaugh PG,Lotan O,Nicholson G.Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells drived from target organs for metastasis.Br J Cancer. 1992: 66-349.
4. Rak JW,Filmus J,Kerbel RS .Reciprocal paracrine interactions between tumor cells and endothelial cells:the angiogenesis progression hypothesis.Eur J Cancer.1996;2432-2438.
5. Folkman J Tumor angiogenesis. In: Holland JR ,Frei E,Bast R, Kute D.Weichselbaum R, eds. Cancer Medicine.4<sup>th</sup> ed .Baltimore: Williams & Wilkins:1996:181;204.
6. Vacca A,Ribatti D,Roncali I. et al.Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma .Br J haematol.1994;87:503.
7. Vacca A, Ribatti D ,Presta M, et al. Bone marrow neovascularization , plasma cell angiogenic potential , and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma.Blood. 1999: 93: 309-64.
8. Ribatti D, Vacca A,Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F.Angiogenesis spectrum in the stroma of b-ceel non hodgkins lymphomas .An immunohistochemical and structural study.Eur J Haemato.1996;56-45.
9. Pardo.T, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia Blood.2000: 95; 2637-2644.
10. Perez –Atayde AR ,Sallan SE ,Tedrow U, Connors S, Allred E ,Folkman J.Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. Am J Pathol.1997: 150-815.
11. Shami PJ Husson JW ,Roogers GM .Evidence of increased angiogenesis in the bone marreow of patients with acute nonlymphocytic leukemia(abstract). Blood. 1998: 92(suppl 1): 512a.
12. Aguayo A,Kantarjian H,Talpaz M, et al. Increased angiogenesis in chronic myeloid leukemia and mylodysplastic syndrome (abstract) Blood.1998;92(suppl 1):607 a.
13. Tallman.M,Nahban.C, Feasner.J et al. Acute promyelocytic leukemiaEvolving therapeutic strategies. Blood.2002; 99:759-767.
14. Aguayo ,A ,Kantarjian. H,et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 2000: 98; 2240-2245.
15. Hussong. Z,Rodgers, G,et al. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. Blood 2000: 15; 309-313.