

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

دکتر زهره صناعت (فوق تخصص)\*، دکتر سیدمحمد توانگر (استادیار)\*، دکتر احمد شریف‌تبریزی (پزشک عمومی)\*\*، دکتر کامران علی‌مقدم (استادیار)\*، دکتر اردشیر قوام‌زاده (استاد)\*، دکتر محمد جهانی (دانشیار)\*  
\* بخش خون و آنکولوژی، 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 می باشد. عوامل موثر در تولید عروق خونی جدید از سلولهای بدخیم و ماکروفاژها و ماست سلها و سلولهای لنفوسیت آزاد می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی عروق خونی جدید در بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی که تحت درمان قرار گرفته‌اند می‌باشد.

**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 می‌گیرند و سپس با رنگ‌آمیزی اختصاصی فاکتور VIII میزان تغییر در عروق خونی مغز استخوان بررسی می‌شود. بعد از جمع آوری آنالیز تصویری میانگین چگالی عروق نمونه‌ها قبل از درمان و بعد از درمان مقایسه گردیدند.

**یافته‌ها:** میانگین MVD (Micro vascular density) قبل از درمان در بیماران APL  $7.7 \pm 1.7$  بود. این میانگین بعد از خاتمه درمان به  $3.1 \pm 0.6$  می‌رسید ( $P < 0.0001$ ). در بیماران غیر APL میانگین MVD قبل از درمان  $3.3 \pm 0.8$  و میانگین MVD بعد از درمان  $3.6$  بود که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود نداشت.

**نتیجه گیری و توصیه‌ها:** به نظر می‌رسد میزان آنژیوژنز در بیماران APL در شروع درمان بالاتر از حد طبیعی است این میزان با درمان آرسنیک کاهش می‌یابد. داروهای متداول شیمی درمانی قادر به کاهش آنژیوژنز در بیماران غیر APL نبوده‌اند. اثر ضد رگزایی داروهای شیمی درمانی در بیماران لوکمی در صورتی قابل توجه خواهد بود که تاثیر بر روی زندگی بودن سلولهای آندوتلیوم 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

آنژیوزنزیس یا بوجود آمدن عروق خونی جدید علت مهمی جهت رشد و زنده ماندن سلولهای نومورال می باشد (۱). عواملی که باعث آنژیوزنزیس می شوند از سلولهای نومورال و یا سلولهای با فتیهای اطراف مانند ماکروفاژ و لنفوسیتها آزاد میگردند. در واقع عوامل آزاد شده از این سلولها باعث افزایش رشد سلولهای آندوتلیال جدار عروق می شوند (۲،۳،۴). آنژیوزنزیس نقش مهمی در پیشرفت و بروز متاستاز در تومورهای 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 لوسمی های حاد دانسیته واسکولار مغز استخوان افزایش می یابد (۹). همچنین به نظر می رسد که بعد از درمان دانسیته عروق مغز استخوان کم شده و یکی از فاکتورهای پروگنوستیک در سرنوشت لوسمی حاد میلوئیدی (Acute myeloid leukemia) میزان افزایش عروق ریز مغز استخوان می باشد. داروی آرسنیک تری اکسید یکی از داروهای جدید موثر در درمان بیماران مبتلا به لوسمی حاد پرومیلوئوسیتیک (Acute promyelocytic leukemia) می باشد (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 می باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان آنژیوزنزیس در مغز استخوان بیماران مبتلا به لوسمی حاد میلوئیدی قبل و بعد از درمان می باشد.

## مواد و روشها

نمونه های 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 ۳x۷ DW5% در عرض ۲-۳ ساعت) و یا رژیم ۳x۷ (سیتارابین ۱۰۰ میلی گرم بر متر مربع بدن و دانورویسین 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 نمونه های حجیم از مغز استخوان بوده نهایتاً ۳۰ بیمار که نمونه های 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 ایمونوهیستوشیمی

بافت به قسمتهای ۳ میکرومتری تقسیم می شود و بر روی لام قرار می گیرند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۶ درجه انکوبه می گردند. مقاطع باقراردادن در محلول های بصورت سریال رقیق شده اتانول و گزیلول تاحدی که به آب مقطر برسد، dewaxed و dehydrate می گردد. سپس تحت تاثیر پروتاز و تریپسین قرار گرفته و با رقت ۱/۶۰۰ آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی فاکتور VWF رنگ آمیزی می گردد (به مدت ۹۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار می گیرد) و نهایتاً بعد از واکنش ایمونو پراکسیداز با هما توکسیلین counter stain می شود. سپس سه قسمت سلولی انتخاب شده و با لنز X20 توسط میکروسکوپ متصل به کامپیوتر بررسی می شدند. مقادیر دیجیتالیزه شده و ناحیه عروقی با استفاده از Image analysis system مشخص شده و بدین ترتیب تحلیل می گردد، که Pixel های تصویری عروقی به کل Pixel ها به عنوان درصد واسکولاریته بیان می گردد. این کار برای هر سه منطقه تکرار می شود و در صورتی لومن عروقی شمرده می شود که با رنگ آمیزی VWF رنگ گرفته باشد

MVD نسبت به قبل از درمان مشاهده شد). همچنین میانگین کاهش میزان MVD در بیمارانی که کاهش MVD رانشان دادن برابر  $2/57 \pm 4/3\%$  بود (حداقل ۱٪ و حداکثر ۱۰٪). مشاهده شد که در بیماران APL با محاسبه همبستگی داده‌ها مقادیر قبل و بعد از درمان با  $R=0/112$  و  $P=1/02$  بایکدیگر 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 آنژیوژنز در تومورهای مختلف نشان داده شده است. در مورد بدخیمی‌های خونی نقش آنژیوژنز 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 رمیسیون کامل سبب کاهش MVD به سطح نرمال می‌گردد (۱۱،۱۰،۹).

به نظر می‌رسد که علت افزایش MVD در لوسمی‌ها ترشح فاکتورهای آنژیوژنیزس 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 آنژیوژنز در بیماران AML-M3 در شروع درمان بالاتر از حد طبیعی است و این میزان با درمان با آرسنیک کاهش می‌یابد که

نمونه‌های BMB بیماران قبل از شروع درمان و بعد از حصول رمیسیون تهیه گردیده بودند. (تعدادی از نمونه‌های روزهای ۱۰ و ۲۰ نیز مطالعه گردید که باتوجه به اینکه تنها از نظر آماری تغییر قابل توجهی بین نمونه‌های روزهای صفر و روز حصول رمیسیون 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 بایکدیگر 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;9) del (6;9) del (9) t (1;3) t (8;21) گزارش شده است. بعد از جمع‌آوری آنالیز تصویری میانگین چگالی عروق (MVD, Micro vascular density) 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  $3/06 \pm 4/48\%$  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

ثابت بامیزان اولیه آنژیوژنز ارتباط دارد بیشتر مؤید خواص آنتی آنژیوژن دارو برای کاهش MVD می باشد. اینکه داروهای متداول شیمی درمانی قادر به کاهش آنژیوژنز در بیماران غیر APL نبوده اند 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.

می تواند به علت خواص آنتی لوسمیک دارو باشد یعنی کاهش سلولهای نارس سبب کاهش آنژیوژنز گردد. اما مطالعه ما همچنین نشان داد که میزان کاهش MVD متعاقب درمان با آرسنیک متناسب است بامیزان اولیه MVD لذا محتمل به نظر می رسد که اثر آنتی آنژیوژن آرسنیک در ایجاد پاسخ موثر باشد چون اگر قرار بود که کاهش آنژیوژنز در بیمارانی که به رمیسیون کامل رسیده اند ناشی از خواص آنتی لوسمیک دارو باشد می باید همه بیماران به سطح ثابتی از MVD می رسیدند ولی اینکه میزان کاهش بایک ضریب همبستگی

## 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 driven 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 myelodysplastic syndrome (abstract) Blood.1998;92(suppl 1):607 a.
13. Tallman.M,Nahban.C, Feasner.J et al. Acute promyelocytic leukemiaEvolving therapeutic strategics. 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.