

مطالعه میزان آنژیوزنر مدل‌های زئوگرافت بومی گلیوبلاستوما مالتی فورم در بیماران ایرانی به روش MVD-CD34

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۲/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: با وجود پیشرفت در زمینه‌های تشخیص و درمان سرطان‌ها، هنوز میزان بقای مبتلایان به گلیوبلاستوما مالتی فورم (GBM) بهبود قابل توجهی نیافته است و درمان‌های دیگری در کنار درمان‌های رایج پیشنهاد شده است. یکی از این درمان‌ها، کنترل و توقف آنژیوزنر تومور از طریق داروها بوده تا از این طریق بتوان سرعت رشد سلول‌های بدخیم را مهار نمود. سنجش تراکم عروق کوچک (MVD) تکنیکی است که در آن عروق خونی رنگ‌پذیر شده توسط ایمونوهیستوشیمی، شمارش می‌گردند. امروزه از موش‌های بی‌موی فاقد ایمنی سلولی به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات سرطان جهت ایجاد مدل تومورهای زئوگرافت استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه، سنجش تراکم عروق کوچک در تومورهای زئوگرافت بومی حاصله از کاشت گلیوبلاستوما مالتی فورم بیماران در موش بوده تا از این مدل‌ها بتوان در تحقیقات داروهای مهارکننده آنژیوزنر استفاده نمود. **روش بررسی:** نمونه‌های توموری تازه از سه بیمار مبتلا به GBM اخذ و بعد از آماده‌سازی اولیه، به‌شکل هتروپایک در پهلوی موش‌های بی‌مو کاشته شد. دو ماه بعد موش‌ها قربانی و تومورها به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل شده و پس از اطمینان از نوع تومور، میزان MVD-CD34 با شمارش نواحی Hot spot در ۲۲ نمونه تعیین گردید. **یافته‌ها:** میزان تراکم عروق کوچک در این تومورها به‌طور میانگین 30 ± 21 شمارش شد. **نتیجه‌گیری:** از مدل زئوگرافت بومی گلیوبلاستوما مالتی فورم می‌توان در مطالعات پیش‌بالینی داروهای مهارکننده آنژیوزنر بر اساس فارماکونومیکس بیماران ایرانی استفاده نمود. همچنین در آینده این امکان وجود دارد که از این مدل‌ها بتوان در پیش‌بینی میزان حساسیت یا مقاومت نسبت به داروهای مهارکننده آنژیوزنر به‌منظور درمان انفرادی سرطان استفاده نمود.

کلمات کلیدی: گلیوبلاستوما مالتی فورم، مدل زئوگرافت، آنژیوزنر، تراکم عروق کوچک، CD34.

سعید امانپور^۱، صمد محمد نژاد^۱
احمد محمد نژاد^۱، زهره مظاهری^۲
مریم کاظم‌حقیقی^۱، محمدعلی عقابیان^۳
علیرضا خوشنویسان^{۴*}

۱- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۲- مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر
(عج)
۳- مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی
۴- گروه جراحی مغز و اعصاب
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس،
خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه
جراحی مغز و اعصاب
تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۰۲۲۱۸
email: akhoshnevisan@yahoo.com

مقدمه

بود که در ده سال آینده با ارایه روش‌های نوین جراحی و همچنین با استفاده از رادیوتراپی تغییر یافته و افزودن درمان‌های هدف‌دار به پروتکل‌های درمانی رایج، میزان بقا بهبود یابد.^۳ چهار دهه از نظریه وابسته بودن رشد تومورها به آنژیوزنر که توسط Folkman مطرح گردید، می‌گذرد و امروزه تلاش بر این است که بتوان رشد تومورها را از طریق مهار رگ‌زایی، متوقف نمود. استفاده از داروهای مهارکننده آنژیوزنر در سرطان‌های پیشرفته پستان و کولورکتال رایج گردیده است و سعی محققان بر این بوده تا از این داروها در درمان GBM نیز استفاده گردد. مهم‌ترین چالش در ارزیابی میزان آنژیوزنر تومورها در انسان و مدل‌های حیوانی، نقیصه تکنیکی می‌باشد، به‌گونه‌ای که تاکنون هیچ روشی نتوانسته است به‌طور کامل نمایانگر میزان

بر طبق آمارهای جهانی، ۲۰/۳٪ از تومورهای اولیه دستگاه عصبی مرکزی را گلیوبلاستوما مالتی فورم (Glioblastoma Multiform (GBM تشکیل می‌دهد. این تومور منشاء نوروپیتالیی داشته و جزء تومورهای آستروسیتی طبقه‌بندی می‌گردد.^۱ با وجود توسعه ابزارهای تشخیصی و همچنین ارایه درمان‌های استاندارد، GBM جزء سرطان‌هایی با پیش‌آگهی بد محسوب می‌گردد، زیرا از یک‌سو مرز بین بافت سالم و سرطانی مغز نامشخص بوده و از طرفی دیگر آستانه تحمل سلول‌های مغزی نسبت به رادیوتراپی پایین می‌باشد.^۲ در پنج سال اخیر تنها توانسته‌اند میزان بقای بیماران را از ۱۰ ماه به ۱۴ ماه افزایش بدهند و با نگاه خوش‌بینانه نسبت به آینده می‌توان امیدوار

انستیتوکانسر دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۹ انجام شد.

حیوانات: جهت انجام این مطالعه از ۳۰ سر موش بی‌موی فاقد تیموس با جنسیت نر و بازه سنی شش تا هشت هفته استفاده شد. این موش‌ها در قفس‌های فیلتر دار Micro isolator در آزمایشگاه کاشت تومورهای تجربی بیمارستان امام خمینی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شدند. آب و غذای اتوکلاو شده نیز به شکل Ad libitum در اختیار حیوانات قرار داده می‌شد. تمام مراحل تحقیق منطبق با اصول اخلاقی بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی طراحی شد.

ایجاد تومور زئونگرافت از تومور اولیه انسانی: نمونه تومور اولیه گلیوبلاستوما مالتی‌فورم از سه بیمار بستری شده در بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بعد از کسب رضایت‌نامه اخلاقی اخذ شد. شایان ذکر است که نتایج پاتولوژی بعد از جراحی ماهیت تومور را تأیید می‌کرد. نمونه‌های توموری بر روی یخ و در داخل محیط کشت استریل RPMI 1640 به آزمایشگاه کاشت تومورهای تجربی انتقال داده و به قطعاتی به ابعاد $1 \times 1 \times 0.5$ میلی‌متر مکعب خرد شدند. به‌ازای تومور هر بیمار، ۱۰ سر موش بی‌موی فاقد تیموس با استفاده از پروتکل بیهوشی متعادل القا شده با داروهای Ketamine ۱۰ درصد (Alfasan؛ هلند) با دوز 100 mg/kg و Xylazine ۲ درصد (Alfasan؛ هلند) به مقدار 10 mg/kg از راه تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس برشی به‌طول پنج میلی‌متر در پوست ناحیه فلانک آن‌ها ایجاد و یک قطعه خرد شده از نمونه توموری به‌شکل زیرجلدی در محل مزبور کاشته شد. در خاتمه، شکاف‌های حاصله با نخ نایلون ۴-۰ بخیه شد.

مطالعات آسیب‌شناسی: دو ماه بعد، موش‌ها به‌روش انسانی قربانی گردیدند. تومورهای حاصله از پوست حیوان جدا و در داخل فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس گشته و به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل گردید. در آزمایشگاه پاتولوژی، بر روی نمونه تومورهای به‌دست آمده، مراحل آماده‌سازی انجام گرفت و با رنگ‌آمیزی H&E و همچنین با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی GFAP و Ki-67 (ساخت شرکت Dako دانمارک)، اسلایدهایی از آن‌ها تهیه گردید و توسط پاتولوژیست، مطالعه و تومور GBM مورد تأیید قرار گرفت.^۷ در همین حین نیز مقطعی از نمونه‌ها توسط آنتی‌بادی CD34 (ساخت شرکت Dako دانمارک)، رنگ‌آمیزی گردید. دو نمونه توموری که کاملاً خصوصیات

آنژیوزن در تومور باشد.^۴ با این‌حال تکنیک سنجش تراکم عروق کوچک (Micro Vessel Density (MVD) کاربردی‌ترین روش ارزیابی عروق توموری محسوب می‌شود. در این روش با استفاده از ایمونوهیستوشیمی، عروق اندوتلیال توسط یکی از آنتی‌بادی‌های vWF، CD31 و یا CD34 رنگ‌آمیزی گردید و در زیر میکروسکوپ تعداد عروق ریز شمرده شد. مطالعات متعدد در GBM نشان می‌دهد که آنژیوزن این تومور به‌عنوان معیار تهاجم محسوب می‌گردد.^۵ در این دسته از تومورها ژن‌های TP53 و PTEN اغلب دچار جهش می‌گردند. با توجه به نقش بیولوژیکی این ژن‌ها در مهار و کنترل آنژیوزن، قابل پیش‌بینی است که افزایش آنژیوزن توموری سبب افزایش پرولیفراسیون سلول‌های توموری گردد و در نتیجه میزان بقا کاهش یابد.^۶ مدل‌های زئونگرافت سرطان‌ها برای مطالعات پایه‌ای و پیش‌بالینی تومورها بسیار مناسب می‌باشند و امروزه مجامع معتبر جهانی از این مدل‌های سرطانی در پیشبرد اهداف درمانی استفاده می‌نمایند. در این مدل‌ها از تلقیح رده‌های سلولی سرطانی معین به موش‌های بی‌موی فاقد تیموس استفاده می‌گردد و یا این‌که نمونه‌های توموری بیماران در بدن موش‌های مذکور کاشته می‌شود. از آنجایی که موش‌های بی‌موی فاقد تیموس دارای نقص در ایمنی سلولی می‌باشند، برخی از رده‌های سلولی سرطانی و نیز قطعات توموری اخذ شده از بیماران در بدن این حیوانات رشد می‌کنند. در این پژوهش، با توجه به امکان استفاده از این موش‌ها، مدل زئونگرافت بومی GBM با بهره‌گیری از نمونه‌های توموری بیماران ایرانی ایجاد گردید و گام نخست جهت انجام مطالعات پیش‌بالینی درون‌تنی (In Vivo) درمان‌های هدف‌دار بر روی آنژیوزن تومور GBM برداشته شد. هدف از این مطالعه ارزیابی تراکم عروق کوچک (MVD) در مدل زئونگرافت بومی نمونه‌های توموری اخذ شده از بیماران ایرانی بود تا از این طریق بتوان تأثیر داروهای مختلف مهارکننده آنژیوزن را بر اساس فارماکوژنومیکس اقوام ایرانی بررسی نمود. در دنیا با استفاده از رده سلولی استاندارد تومور GBM، تأثیر مهارکننده‌های رگ‌زایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما مدل زئونگرافت مستقیم این تومور می‌تواند اختلافات فارماکوژنومیکس را بهتر آشکار سازد.

روش بررسی

مراحل اجرایی مطالعه تجربی حاضر در مرکز تحقیقات سرطان



شکل-۱: شکل بالا: مدل زئونگرافت هتروتاپیک GBM. شکل پایین: نمای ریزیابی تومور زئونگرافت GBM در درشت‌نمایی $\times 400$. پیکان‌ها نشان‌گر عروق اندوتلیال توموری رنگ‌شده با آنتی‌بادی CD34 می‌باشند.

کرد.^{۱۵} Beal در یک مقاله مروری، به نقش درمان‌های مهارکننده آنژیوژنز در GBM پرداخت و نقش MVD را در ارزیابی آنژیوژنز یادآور شد.^{۱۶} همان‌طور که ذکر گردید، در اغلب مطالعات به‌منظور ارزیابی میزان آنژیوژنز مدل زئونگرافت GBM، از یک‌سو از مارکر CD31 و از سوی دیگر عمدتاً رده سلولی استاندارد U-87MG استفاده می‌شود. در این مطالعه، برخلاف مطالعات قبلی اولاً مدل از تومور GBM بیماران ایرانی حاصل گردیده است و ثانیاً از مارکر CD34 جهت ارزیابی آنژیوژنز استفاده شده است. این مدل برای تحقیقات فارماکولوژیکی مناسب بوده و می‌توان با استفاده از این مدل، تأثیرات داروهای مختلف مهارکننده آنژیوژنز را مورد آزمون و مطالعه قرار داد. با عنایت به این‌که منبع جداسازی اغلب رده‌های سلولی سرطانی از بیماران اقوام غربی می‌باشد، لذا احتمالاً رده‌های مذکور از نظر فارماکونومیکس اختلافاتی با رده‌های سلولی بومی جداسازی‌شده از بیماران ایرانی خواهند داشت. بنابراین گرفتن تومورهای مستقیم از بیماران و ایجاد رده‌های سلولی بومی می‌تواند در تحقیقات پیش‌بالینی سرطان بر اساس فارماکونومیکس اقوام ایرانی مفید واقع شود. تعیین رژیم‌های شیمی‌درمانی انفرادی برای هر بیمار از راه سنجش پیش

GBM را نشان می‌دادند، انتخاب گردید و میزان MVD به‌شکل شمارش چهار میدان Hot spot در زیر میکروسکوپ (HPF) تعیین و میانگین آن به‌عنوان MVD آن نمونه محاسبه شد. به‌دلیل وجود نکروز نسبتاً زیاد در تومور GBM، سعی گردید تمام لومن‌های بدون جدار عروقی و همچنین اندوتلیال‌های تکی از نواحی نکروزه تفکیک شود و برای کاهش خطای شمارش، هر اسلاید دوبار و با فاصله زمانی سه روزه مطالعه شد. نتایج به‌شکل انحراف معیار $\pm$ میانگین گزارش گردید.

یافته‌ها

میزان MVD در مدل‌های زئونگرافت GBM، $30 \pm 2/1$ عدد شمارش گردید. میزان رنگ‌پذیری عروق اندوتلیالی به‌نسبت خوب بوده و فقط نکروز بالا در اسلاید سبب می‌گردید که تفريق سلول‌های نکروزه شده با اندوتلیال‌ها با دقت و تأمل همراه باشد (شکل ۱).

بحث

بالا بودن میزان آنژیوژنز در هر توموری نشان‌گر افزایش قدرت تهاجم و متاستاز می‌باشد، اما در تومورهای اولیه سیستم عصبی مرکزی معمولاً متاستازی وجود ندارد و تنها تهاجم توموری مطرح می‌باشد.^۸ MVD علی‌رغم نقایصی که دارد، به‌دلیل سادگی و ارزان بودن نسبت به روش‌های دیگر ارزیابی آنژیوژنز، از ارجحیت برخوردار است. در این میان، مارکر CD34 نسبت به سایر مارکرها حساسیت و ویژگی بالاتری دارد، زیرا این مارکر علاوه بر این‌که سلول‌های اندوتلیال عروق خونی را رنگ‌پذیر می‌سازد، تا حدی عروق لنفاتیک را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد و لذا نسبت به مارکر CD31 ارجح می‌باشد.^{۹-۱۱} این مطالعه توانست به‌خوبی عروق کوچک تازه تشکیل‌یافته تومور زئونگرافت را نمایان بسازد. با این وجود MVD-CD34 دارای محدودیت‌هایی می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها رنگ گرفتن سلول‌های نکروتیک و همچنین عروق دارای جدار می‌باشند. همچنین خطای شمارنده نیز از دیگر محدودیت‌های آن محسوب می‌گردد.^{۱۲،۱۳} با این وجود شاخص مذکور می‌تواند معیار مناسبی جهت ارزیابی آنژیوژنز توموری محسوب گردد. Zhou به‌منظور مطالعه شاخص نرمال‌سازی عروقی در مدل اورتوتاپیک GBM از مارکر CD31 استفاده نمود.^{۱۴} Kang برای ارزیابی اثرات یک ترکیب صنعتی ضد VEGF در مدل هتروتاپیک GBM از مارکر CD31 استفاده

حاضر می‌تواند در تعیین حساسیت و مقاومت تومور GBM بیماران به‌منظور درمان انفرادی سرطان به‌کار گرفته شود.

بالینی حساسیت تومورها به داروهای ضد سرطان یکی از اهداف آرمانی تحقیقات سرطان‌شناسی می‌باشد.^{۱۷} مدل ایجاد شده در مطالعه

References

- DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Neoplasms of the central nervous system. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Textbook of Surgical Oncology*. 8th ed. Lippincott: Williams and Wilkins 2008. p. 1967-2032.
- Stevenson CB, Thompson RC. Neurosurgical oncology: neoplasms of the brain and meninges. In: Poston GJ, Beauchamp RD, Ruers T, editors. *Textbook of Surgical Oncology*. Distributed in North and South America by Taylor and Francis; 2007. p. 393-410.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60(3):166-93.
- Schneider M, Tjwa M, Carmeliet P. A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell* 2005;7(1):3-4.
- Nolan C. Primary neoplasms of the central nervous system in Adults. In: Kufe DW, Bast RC, Hait WN, Hong WK, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al, editors. *Cancer Medicine*. 8th ed. PMPA-USA; 2010. p. 882-3.
- Kerbel R. Molecular origins of cancer: tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358(19):2039-49.
- Khoshnevisan A, Muhammadnejad A, Muhammadnejad S, Mazaheri Z, Kazem Haghighi M, Targari F, et al. Establishment of autochthonous and standard cell line derived xenograft models of glioblastoma multiform in Iran. *Basic and Clin Cancer Res* 2011;3(1):52-9.
- Striker TP, Kumarr V. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. *Robbins basic pathology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2010. p. 309-10.
- Mazur G, Wróbel T, Dziegiel P, Jeleń M, Kuliczowski K, Zabel M. Angiogenesis measured by expression of CD34 antigen in lymph nodes of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42(4):241-3.
- Christensen K, Schröder HD, Kristensen BW. CD133(+) niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes. *J Neurooncol* 2010 Dec 24. [Epub ahead of print]
- Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled α Vbeta3-integrin and α V beta5-integrin imaging agent. *J Nucl Med* 2011;52(3):424-30. Epub 2011 Feb 14.
- Eshghyar N, Motahhary P, Rahrotaban S. Evaluation of microvascular density by CD34 in squamous cell carcinoma of the tongue and its relationship with cervical lymph node metastasis. *J Dental Med* 2009;21(4):233-41.
- Javadi P, Haeri H. Tumor angiogenesis in colorectal cancer, correlation with tumor extension and invasion. *Tehran Uni Med J (TUMJ)* 2001;59(4):50-6.
- Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro Oncol* 2009;11(3):301-10. Epub 2008 Oct 29.
- Kang YA, Shin HC, Yoo JY, Kim JH, Kim JS, Yun CO. Novel cancer antiangiotherapy using the VEGF promoter-targeted artificial zinc-finger protein and oncolytic adenovirus. *Mol Ther* 2008;16(6):1033-40. Epub 2008 Apr 8.
- Beal K, Abrey LE, Gutin PH. Antiangiogenic agents in the treatment of recurrent or newly diagnosed glioblastoma: analysis of single-agent and combined modality approaches. *Radiat Oncol* 2011;6:2.
- Fiebig HH, Maier A, Burger AM. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer* 2004;40(6):802-20.

Studying angiogenesis in autochthonous xenograft models of glioblastoma multiforme by MVD-CD34 technique in Iranian patients

Received: April 04, 2011 Accepted: May 18, 2011

Abstract

Saeid Amanpour DVSC.¹
Samad Muhammadnejad DVM.¹
Ahad Muhammadnejad DVM.¹
Zohreh Mazaheri MSc.²
Maryam Kazem-Haghighi BSc.¹
Mohammadali Oghabian PhD.³
Alireza Khoshnevisan MD.^{4*}

1- Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

3- Research Center for Science and Technology in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Department of Neurosurgery, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Background: Despite advances in cancer diagnosis and treatment, survival rate of patients suffering from *glioblastoma multiforme (GBM)* has not been significantly improved. Therefore, novel therapeutic adjuncts to routine therapies have been suggested over time. Inhibition of angiogenesis by antiangiogenic drugs is one of the new approaches to inhibit the growth of malignant cells. *Microvessel density (MVD)* assay is a technique performed by counting immunohistochemically-stained blood vessels. Nowadays, athymic nude mice are widely used for the establishment of xenograft tumor models in cancer research. The aim of this study was to evaluate the MVD of autochthonous xenograft models of *GBM* isolated from Iranian patients for use in pharmaceutical research on antiangiogenic drugs.

Methods: Fresh tumor samples of *GBM* were obtained from three patients in Cancer Institute of Tehran University of Medical Sciences in Fall of 2010 and Winter of 2011. After preliminary processing, minced tumor samples were implanted heterotopically on flanks of athymic nude mice. Two months later, the animals were sacrificed and the xenograft tumor samples were sent to the pathology laboratory. After establishing the proof of the xenograft tumor type, *MVD-CD34*, an endothelial cell marker, was assessed by counting hot spot areas in 22 samples.

Results: The mean number of microvessels in these xenograft tumor models was 30 ± 2.1 .

Conclusion: These autochthonous xenograft models of *GBM* can be used in preclinical settings for research on antiangiogenic drugs regarding a pharmacogenomics-based treatment regimen for the Iranian population. Moreover, such models can be used in future studies for determining the sensitivity or resistance to antiangiogenic drugs in individualized cancer therapy.

Keywords: Angiogenesis, CD34, *glioblastoma multiforme*, microvessel density, xenograft model.

* Corresponding author: Dept. of Neurosurgery, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Qods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-88602218
email: akhoshnevisan@yahoo.com