

# بررسی آنژیوژن در لوسمی‌های حاد و مقایسه آن با بافت طبیعی مغز استخوان

دکتر محمد هادی صادقیان<sup>۱</sup>- دکتر نوریه شریفی<sup>۲</sup>- دکتر حسین آیت‌اللهی<sup>۳</sup>-  
دکتر محمد خواجه دلوی<sup>۴</sup>

## چکیده

زمینه و هدف: آنژیوژن نقش عمده‌ای در تهایم و متاستاز تومورهای بدن دارد. در برخی از سرطان‌ها رابطه بین آنژیوژن و پیش‌آگهی بد بیماری بخوبی نشان داده شده است؛ اما در مورد آنژیوژن در نتوپلاسم‌های همان‌تلوزیک مطالعات بسیار محدودی انجام شده است. تحقیق حاضر با هدف انجام مقایسه‌ای بین بافت طبیعی و درگیری لوسمیک مغز استخوان از نظر آنژیوژن که با MVD (Microvessel Density) (ازیابی می‌گردد، انجام شد).

روش تحقیق: در این مطالعه مورد-شاهدی، با مراجعه به بایگانی بخش آسیب‌شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد، تعداد ۳۰ مورد لوسمی حاد (بافت مغز استخوان) و ۳۰ مورد بافت طبیعی مغز استخوان انتخاب شدند. لامها و بلوک‌های آنها استخراج و لامها بازبینی شدند. پس از تایید نهایی از بلوک‌های پارافینی برش نازک تهیه شد و بر روی برش‌ها رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی با نشانگر عامل رشد سلول‌های اندوتیال (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) انجام شد. پس از تهیه لام‌های مناسب، تعداد عروق کوچک یا MVD از شمارش عروق در نقاط با حداکثر تراکم عروقی (Hot Spot) در میدان دید میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر گزارش گردید.

یافته‌ها: میزان MVD یا آنژیوژن در لوسمی حاد (۲۰/۲) به طور مشخصی بیشتر از افراد گروه شاهد (۶/۹) بود. از نظر آماری تفاوت در میزان MVD بین دو گروه بیماران مبتلا به لوسمی حاد و بافت طبیعی معنی‌دار بود ( $P<0.001$ ).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق، نشان داد که آنژیوژن در لوسمی حاد به طور مشخصی بیشتر از افراد گروه شاهد (دارای بافت طبیعی) است اما تفاوت چندانی بین دو گروه لوسمی حاد لنفوبلاستیک و میلوبلاستیک وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: سرطان خون؛ تراکم عروقی کوچک؛ ایمنو‌هیستوشیمی؛ آنژیوژن

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیر جند (دوره ۱۵؛ شماره ۲؛ تابستان سال ۱۳۸۷)

دریافت: ۱۳۸۶/۵/۲۷ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۹/۲۹ پذیرش: ۱۰/۱۱

<sup>۱</sup> نویسنده مسؤول؛ استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (گروه خون‌شناسی و بانک خون) آدرس: مشهد- بیمارستان قائم- بخش همان‌تلوزی

تلفن: ۰۵۱-۸۰۱۲۵۸۴، نامبر: ۰۹۶۱۲-۰۸۴۱۱، پست الکترونیک: sadeghianmh@mums.ac.ir

<sup>۲</sup> دانشیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

<sup>۳</sup> استادیار گروه آموزشی آسیب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (گروه خون‌شناسی و بانک خون)

<sup>۴</sup> دانشیار گروه آموزشی پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

## مقدمه

پیتیدهای مهم رگساز هستند، با مشخصات کلینیکی لوسمی‌ها و همچنین رابطه‌ای از افزایش MVD با طول عمر بیماران مبتلا به میلوم متعدد گزارش شده است (۵). آنژیوژنر یا رگسازی، عنصری مهم برای پیشرفت تومورها بوده و با تشکیل عروق مویرگی از عروق قبلی موجود در بافت تعريف می‌گردد. تومورها برای رشد به مواد غذایی که توسط عروق به آنها ارائه می‌شود، نیازمندند و با تحریک رگسازی این نیاز خود را فراهم می‌کنند. تومورها نمی‌توانند بدون آنژیوژنر، قطری بیش از ۲-۱ میلیمتر پیدا کنند و با افزایش اندازه بیش از این مقدار در اثر هیپوکسی سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند. آنژیوژنر نه تنها برای رشد تومور اوایله بلکه برای بروز متاستاز نیز ضروری است؛ بدین جهت آنژیوژنر یک عنصر بیولوژیک ضروری برای بدخیمی‌ها محسوب می‌شود (۶-۵).

آنژیوژنر در تومورهای سولید بدن نظیر سرطان پستان، ریه، کولون و تیروئید در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۱۰-۷).

علاوه بر تومورهای سولید، تعدادی مقاله در مورد آنژیوژنر در نئوپلاسم‌های هماتولوژیک نیز وجود دارد که مؤید اثر آنژیوژنر بر پیش‌آگهی و همین طور عاملی مؤثر در تعیین خط مشی درمان بیماران مبتلا به انواع مختلف بدخیمی‌های هماتولوژیک است (۱۱-۱۳).

در کشور ما نیز تحقیقات انجام شده بیشتر بر وضعیت آنژیوژنر در تومورهای سولید متمرکز بوده است (۱۰-۸). با توجه به شیوع نسبتاً بالای لوسمی در کشور ما، شناخت عوامل مؤثر بر پاتوژنر، پیش‌آگهی و درمان این بیماران ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه بر آن شدیم که از روش ارزشمند ایمنوهویستوشیمی با استفاده از VEGF\*\* که نشانگر مناسبی برای سلول‌های اندوتیال عروق است، به بررسی میزان آنژیوژنر در نمونه‌های بیماران مبتلا به لوسمی حاد پرداخته و مقایسه‌ای با بافت طبیعی انجام دهیم. بدیهی

سرطان‌های سیستم خون‌ساز از شایعترین بدخیمی‌های بدن محسوب می‌گردند. بر اساس طبقه‌بندیهای گروه فرانسوی، آمریکایی، بریتانیایی\* و سازمان بهداشت جهانی، شایعات رده میلوبئید و لنفوئید در گروههای جداگانه‌ای تقسیم‌بندی می‌شوند (۱). شایعترین نوع لوسمی حاد در کودکان، لوسمی لنفوبلاستیک حاد<sup>†</sup> و در بالغین لوسمی میلوبلاستیک حاد<sup>‡</sup> است (۲). بر اساس گزارش انتستیتو کانسر آمریکا، میزان بروز سالیانه لوسمی لنفوبلاستیک حاد بدون در نظر گرفتن سن، ۱/۴ در هر ۱۰۰/۰۰۰ است. میزان بروز لوسمی میلوبلاستیک حاد با افزایش سن بیشتر شده، حداقل شیوع آن در سن ۶۸ سالگی بوده و میزان بروز آن ۳/۴ در هر ۱۰۰/۰۰۰ است (۳).

در کشور ما نیز این سرطان شایع است؛ اگرچه آمار دقیقی در دسترس نیست ولی بر اساس گزارش کشوری، ثبت موارد سرطانی در سال ۱۳۸۲ انجام شده توسط مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در این سال ۶۷۷ مورد لوسمی در زنان و ۱۰۵۷ مورد در مردان گزارش شده که این بیماری هشتادمین سرطان شایع بدن بوده و در کل ۴/۰۲٪ سرطان‌های زنان و ۴/۸۹٪ سرطان‌های مردان را شامل می‌شود؛ البته همان‌طور که در قسمت نتیجه‌گیری این گزارش ذکر شده است، به علت گوناگونی مراکز تشخیصی لوسمی‌ها و عدم ارائه آمار از طرف برخی از مراکز، ارقام ارائه شده بسیار کمتر از مقدار واقعی آن است (۴). به جهت شیوع بیماری شناسایی عوامل مؤثر در پاتوژنر بیماری اهمیت زیادی دارد. در سالهای اخیر آنژیوژنر در بدخیمی‌های هماتولوژیک از جنبه‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است؛ برای مثال رابطه افزایش عامل رشد سلول‌های اندوتیال و عامل رشد فیبروبلاستی<sup>§</sup> که از

\* French-American-British (FAB)

<sup>†</sup> Acute lymphoblastic leukemia (ALL)

<sup>‡</sup> Acute myeloblastic leukemia (AML)

<sup>§</sup> Basic fibroblastic growth factor (bFGF)

\*\* Vascular Endothelial Growth Factor

درجات خلوص مختلف انجام شد. جهت بازیافت آنتیزن از محلول بافر نیترات ۱/۰۱ مولار در محیط مایکروویو به مدت ۱۲ دقیقه استفاده شد و سپس رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی به روش آویدین- بیوتین- پراکسیداز و با استفاده از نشانگر VEGF انجام شد. آنتی بادی مونوکلونال به کار رفته در این طرح دارای مشخصات زیر بود:

-Monoclonal mouse antihuman Vascular Endothelial Growth Factor  
-Dacocytomatins, Denmark, code: M 7273, clone: VG1

در مرحله آخر نیز از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین مایر به جهت رنگ‌آمیزی زمینه لام استفاده شد و پس از آب‌گیری لامل چسبانده شد.

اسلایدهای ایمنوهیستوشیمی تهیه شده بعد از تطابق با برشهای اولیه توسط دو نفر متخصص آسیب‌شناسی بررسی و تفسیر شدند. از آنجا که روش ایمنوهیستوشیمی یک فرایند تشخیصی چند مرحله‌ای است، بنابراین باید در انتخاب بافت، فیکساسیون، پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی دقت فراوان به کار رود. در حد امکانات و توان سعی شد اسلايدهای مناسب جهت رنگ‌آمیزی انتخاب و کنترل دقیق در مراحل رنگ‌آمیزی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گیرد تا از نتایج مثبت و منفی کاذب پیشگیری شود. ضمن این که بررسی لامها توسط دو نفر متخصص آسیب‌شناسی انجام شد تا خطای دید احتمالی به حداقل برسد. جهت تهیه شاهد منفی، آنتی بادی از محیط آزمایش حذف و در مورد شاهد مثبت از عضله رحمی با مقاطع عروقی مشخص استفاده گردید.

جهت تعیین تراکم عروقی به این ترتیب عمل شد که ابتدا با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر میکروسکوپ نوری از نوع استخوان رویت شد؛ سپس کانونی با بیشترین تراکم مقاطع عروقی و سلول‌های آندوتیال رنگ گرفته انتخاب و در

است در صورت اثبات افزایش آنژیوژنر (و میزان عروق کوچک درون تومور) درمان ضایعه به سمت کنترل آنژیوژنر گرایش خواهد یافت.

## روش تحقیق

جهت انجام این تحقیق که نوعی مطالعه مورد- شاهدی محسوب می‌گردد، با مراجعه به بایگانی بخش آسیب‌شناسی بیمارستان قائم (عج) مشهد، از بین نمونه‌های بیوپسی مغز استخوان در سالهای اخیر (۱۳۷۶- ۱۳۸۶) که بافت کافی و مناسب برای بررسی ایمنوهیستوشیمی داشتند، ۳۰ مورد بافت لوسمی حاد و تعداد ۳۰ مورد بافت طبیعی مغز استخوان به عنوان گروه شاهد انتخاب گردید. اطلاعات بالینی بیماران از پرونده موجود در بخش آسیب‌شناسی و اسلايدهای آنها از بایگانی استخراج شد. اسلايدهای دو گروه مورد و شاهد توسط دو آسیب‌شناس به منظور تأیید تشخیص، کفايت نمونه‌ها مجدد بررسی گردید. در صورت عدم مناسب بودن لام‌ها، برش مجدد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H & E) برای آنها انجام شد. به منظور تأیید و تکمیل اطلاعات بیماران، نتایج آسپیراسیون مغز استخوان نیز از بایگانی بخش هماتولوژی و از پرونده بیماران، مورد بررسی قرار گرفت؛ همچنین در صورت لزوم اسلايدهای آسپیراسیون مغز استخوان جهت تأیید نوع لوسمی که بر اساس معیارهای FAB طبقه‌بندی شده بودند، بازبینی شد؛ مغز استخوان طبیعی نیز به عنوان نمونه‌های شاهد از بیوپسی‌هایی که برای درگیری مغز استخوان از نظر لنفوم فرستاده شده و منفی گزارش شده بودند، انتخاب گردید.

بعد از تأیید نهایی از نظر تشخیص، کیفیت و کفايت نمونه‌ها، بلوک‌های پارافینی اسلايدهای مربوطه از بایگانی استخراج و از روی آن برشهایی نازک به ضخامت حدوداً ۴ میکرون تهیه شد. در مرحله بعد، از برشهای به مدت ۲۴ ساعت در حرارت هوای اتاق نگهداری شد (انکوباسیون)؛ سپس پارافین‌زدایی با گزیل و بعد آب‌دهی با استفاده از الکل با

بیماران مبتلا به لوسی میلوبلاستیک حاد در مطالعه حاضر شامل یک مورد M0، یک مورد M1، پنج مورد M2، یک مورد M3، دو مورد M4 و بیماران مبتلا به لوسی لنفوبلاستیک حاد شامل پنج مورد L1، چهارده مورد L2 و یک مورد L3 بود.

از ۳۰ بیمار لوسی مورد بررسی قرار گرفته ۲۰ بیمار (۶۶٪) مرد و ۱۰ بیمار (۳۳٪) زن بودند. کمترین سن بیماران ۱۷ و بیشترین ۷۱ سال با میانگین سنی ۳۶/۲ سال بود.

در بین ۱۰ بیمار لوسی میلوبلاستیک حاد مورد بررسی قرار گرفته ۶ بیمار (۶۰٪) مرد و ۴ بیمار (۴۰٪) زن، کمترین سن بیماران ۱۷ سال، بیشترین سن ۷۱ سال و میانگین سنی ۳۷/۳ سال بود؛ همچنین از ۲۰ بیمار لوسی لنفوبلاستیک حاد مورد بررسی قرار گرفته ۱۴ بیمار (۷۰٪) مرد و ۶ بیمار (۳۰٪) زن بودند. کمترین سن بیماران ۱۷ و بیشترین ۶۸ سال با میانگین سنی ۳۵/۷ سال بود.

در بیماران مبتلا به لوسی حاد، کمترین و بیشترین میزان تراکم عروق کوچک به ترتیب ۱۷ و ۲۴ و میانگین  $20/2 \pm 1/8$  و در گروه شاهد این اعداد به ترتیب ۵، ۱۲ و  $6/9 \pm 1/7$  بود. از نظر آماری تفاوت در میزان MVD بین دو گروه بیماران مبتلا به لوسی حاد و بافت طبیعی معنی‌دار بود ( $P < 0.001$ ) ( $t = 29/6$ ).

در بین بیماران مبتلا به لوسی میلوبلاستیک حاد، کمترین و بیشترین میزان تراکم عروق کوچک به ترتیب ۱۷ و ۲۳ با میانگین  $20/3 \pm 0/30$  و در بین بیماران مبتلا به لوسی لنفوبلاستیک حاد، به ترتیب ۱۷ و ۲۴ با میانگین  $20/15 \pm 0/15$  بود. بین دو گروه بیماران مبتلا به AML و ALL میزان تفاوت MVD معنی‌دار نبود ( $P = 0/83$ ).

همچنین میانگین MVD در زیرگروههای لوسی حاد، به ترتیب ۲۳ در M0، ۲۲ در M1،  $18/8$  در M2، ۲۲ در M3، ۲۱ در M4،  $20/4$  در L1،  $20/1$  در L2 و ۲۰ در L3 بود (جدول ۱).

بزرگنمایی ۴۰۰ برابر شمارش مقاطع عروقی در آن کانون انجام شد و تعداد آنها به عنوان MVD گزارش گردید. عروق دارای دیواره عضلانی و عروق پریوست استخوان شمارش نشدنند.

لازم به توضیح است اگر چه در مطالعات قبلی انجام شده نشانگر VIII-R (عامل فون ویلبراند)، اغلب مورد استفاده قرار گرفته ولی چون در بررسیهای ما نتایج رنگ‌آمیزی با این نشانگر و مقایسه آن با شاهدهای مثبت و منفی رضایت‌بخش نبود، نشانگر عروقی (ایمنوهیستوشیمی) دیگری به نام VEGF مورد استفاده قرار گرفت که در مقایسه با شاهدهای مثبت و منفی نتایج قابل قبول و رضایت‌بخشی داشت؛ همچنین نشانگر CD34 به علت راکتیویتی در سلول‌های بلاست سبب نتایج مثبت کاذب می‌شد.

این بررسی بر روی بلوک‌های پارافینی نگهداری شده در بایگانی بیمارستان انجام شد و از بیماران نمونه‌گیری مجدد به عمل نیامد و از طرف دیگر با توجه به محفوظماندن مشخصات فردی بیماران، سعی شد تا حد ممکن نکات اخلاقی و اخلاق پزشکی رعایت گردد.

نتایج حاصله از ایمنوهیستوشیمی در دو گروه شاهد و مورد در رایانه ثبت و به کمک نرم‌افزار (11.5) SPSS و با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov توزیع نرمال داده‌ها تایید گردید و ارزیابی آماری با استفاده از آزمون t در سطح معنی‌داری  $P \leq 0.05$  انجام گردید.

## یافته‌ها

در این مطالعه تعداد ۳۰ مورد بافت طبیعی مغز استخوان و ۳۰ مورد لوسی حاد شامل ۱۰ مورد لوسی میلوبلاستیک حاد و ۲۰ مورد لوسی لنفوبلاستیک حاد انتخاب شدند و میزان تراکم عروق کوچک یا MVD در نقاط حداکثر تراکم یا نقاط داغ بررسی گردید. در کنار آن عواملی نظیر سن، جنس، نوع لوسی و زیر گروههای آن مورد بررسی قرار گرفتند و ارتباط آن با MVD ارزیابی شد.

جدول ۱- مقادیر MVD در زیرگروههای لوسمی حاد

نوع لوسمی	تعداد لوسمی	درصد لوسمی	حداقل MVD	MVD حداکثر	MVD متوسط	انحراف معیار	حد پایین	حد بالا	در محدوده %۹۵
AML-M0	۱	۳,۳	۲۳,۰۰	۲۳,۰۰	۲۳,۰۰	-	-	-	-
AML-M1	۱	۳,۳	۲۲,۰۰	۲۲,۰۰	۲۲,۰۰	-	-	-	۲۱,۳۴
AML-M2	۵	۱۶,۷	۲۱,۰۰	۲۱,۰۰	۱۸,۸۰	۲,۰۴	۱۶,۲۵	۲۱,۳۴	۱۶,۲۵
AML-M3	۱	۳,۳	۲۲,۰۰	۲۲,۰۰	۲۲,۰۰	-	-	-	-
AML-M4	۲	۳,۳	۲۱,۰۰	۲۱,۰۰	۲۱,۰۰	۰,۰۰	۲۱,۰۰	۲۱,۰۰	۲۱,۰۰
ALL-L1	۵	۱۶,۷	۱۹,۰۰	۲۲,۰۰	۲۰,۴۰	۱,۱۴	۱۸,۹۸	۱۸,۸۱	۱۸,۸۱
ALL-L2	۱۴	۴۶,۷	۱۷,۰۰	۲۴,۰۰	۲۰,۰۷	۱,۸۹	۱۸,۹۷	۱۸,۹۷	۲۱,۱۶
ALL-L3	۱	۳,۳	۲۰,۰۰	۲۰,۰۰	۲۰,۰۰	-	-	-	-

رشد اپیدرمال<sup>۳</sup>، ایترولوکین ۱ و ۶ و همچنین اندوستاتین<sup>۴</sup> بوده که در بین اینها دو پیتید اول مهمتر هستند (۴-۳).

بر اساس مطالعه Padro و همکاران که به روش ایمنوهیستوشیمی انجام شد، ۶۲ بیمار مبتلا به AML با نشانگرهای ترومومدولین و عامل فون ویلبراند بررسی شدند و MVD از میانگین نتایج در سه کانون داغ با بزرگنمایی ۵۰۰ برابر میکروسکوپ گزارش گردید. بر اساس نتایج آنها ۲۴ MVD در بیماران AML بالاتر از گروه شاهد (به ترتیب ۱۱/۲) بود؛ همچنین با درمان، مقدار MVD کاهش می‌یافتد که این کاهش در Remission (Remission) کامل بیشتر از Remission ناکامل بود. آنها نتیجه گرفتند که درمانهای ضد آنژیوژنر، می‌تواند راهبرد جدید در درمان AML باشد (۱۷).

در مطالعه دیگری بیست بیمار مبتلا به AML به همراه ۲۰ نمونه طبیعی مغز استخوان با استفاده از نشانگرهای ULEX-E و عامل فون ویلبراند بررسی شدند و تعداد عروق در طول نمونه شمرده شد و عدد به دست بر مقدار طول مغز استخوان تقسیم گردید و نتایج به صورت تعداد عروق در میلیمتر مغز استخوان گزارش شد. نمونه طبیعی از نمونه‌هایی

با توجه به این که تعداد بیماران مورد مطالعه قرار گرفته در بعضی از زیرگروههای لوسمی حاد، بسیار کم بود، بررسیهای آماری در بین چند زیرگروه شایعتر مرکز گردید. بر این اساس بین L2 و M2 ( $P=0/22$ ) و بین L1 و M2 ( $P=0/16$ ) و بین L1 و L2 با ( $P=0/72$ ) تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در میزان MVD به دست نیامد.

## بحث

آنژیوژنر را می‌توان با روش‌های مختلفی بررسی کرد. یکی از این روشها ایمنوهیستوشیمی با یکی از نشانگرهای سلول‌های اندوتیال نظیر R, VIII-R, CD31, CD34 و ... است (۱۴,۱۵). در این روش تعداد عروق کوچک (MVD) موجود در فیلد میکروسکوپ به عنوان معیاری از آنژیوژنر گزارش می‌شود. روش دوم استفاده از روش‌های مختلف و غیرهای جمی رادیولوژی نظیر سونوگرافی داپلر، PET<sup>\*</sup> و MRI<sup>†</sup> است. روش دیگر اندازه‌گیری مقدار سرمی و یا بافتی پیتیدهای محرك و مؤثر در آنژیوژنر نظیر VEGF، bFGF، VEGF عامل رشد مشتق شده از پلاکت<sup>‡</sup>، عامل

<sup>§</sup> Epidermal growth factor (EGF)

<sup>\*\*</sup> Endostatin

<sup>\*</sup> Magnetic resonance imaging

<sup>†</sup> positron emission tomography

<sup>‡</sup> Platelet-derived growth factors (PDGF)

لوسمی مقاوم به درمان میزان ۲۱/۸۳ MVD چندانی با MVD بیماران نداشت. بر اساس مطالعه آنان میزان MVD در ALL معادل ۲۳/۰۹ و در ANLL معادل ۲۲/۳۷ بود که تفاوت چندانی بین این دو گروه مشاهده نشد؛ همچنین بین زیرگروههای AML نیز تفاوت زیادی وجود نداشت. بر اساس مطالعه آنها رابطه‌ای بین میزان MVD و تعداد درصد بلاست مغز استخوان مشاهده گردید (۲۰).

همان‌طور که مشخص است به دلیل فقدان دستورالعمل استاندارد برای تعیین MVD، روشهای به کار رفته توسط محققین و نیز بزرگنمایی میکروسکوپی مورد استفاده و احتمالاً نوع میکروسکوپ به کار رفته با یکدیگر متفاوت است؛ بنابراین بدیهی است که اعداد به دست آمده کمی با یکدیگر تفاوت دارند. اما نتایج مطالعه حاضر بسیار مشابه مطالعات یاد شده بخصوص مطالعه آخری بود؛ بدین صورت که میزان MVD یا آنژیوژن در لوسمی حاد، به طور مشخصی بیشتر از افراد گروه شاهد بود. تفاوت چندانی بین آنژیوژن در دو گروه لوسمی حاد لنفوبلاستیک و میلوبلاستیک و همچنین بین زیرگروههای آنها وجود نداشت.

پاسخ به درمان لوسمی‌ها با داروهای ضد آنژیوژن (نظیر تالیدومید) نیز توسط بعضی از محققین مورد بررسی قرار گرفته است. Steins و همکاران ۲۵٪ پاسخ درمانی را با تالیدومید گزارش کردند (۲۱).

### نتیجه‌گیری

آنژیوژن در لوسمی حاد افزایش یافته و به طور مشخصی بیشتر از افراد گروه شاهد بود اما تفاوت چندانی بین دو گروه لوسمی حاد لنفوبلاستیک و میلوبلاستیک وجود ندارد. در مطالعه حاضر از هر بیمار یک برش از محل مناسب انتخاب و مورد رنگ‌آمیزی ایمنوھیستوشیمی قرار گرفت. بدیهی است تهیه برشهای فراوان‌تر تخمین دقیق‌تری از میزان MVD به دست خواهد داد؛ همچنین پیگیری بیماران ارتباط MVD با میزان پیش‌آگهی را روشن خواهد ساخت.

که برای درگیری مغز استخوان از نظر لنفوم و یا ارزیابی پان سیتوپنی ارسال شده و منفی گزارش شده بودند، انتخاب گردید. بر اساس نتایج آنها تعداد عروق در لوسمی میلوبلاستیک حاد و نمونه طبیعی به ترتیب ۸/۳ و ۴/۳ با نشانگر ULEX-E و اعداد ۸/۶ و ۴/۹ با نشانگر عامل فون ویلبراند به دست آمد که این اختلاف بین دو گروه شاهد و مورد از نظر آماری معنی‌دار بود اما بین زیرگروههای لوسمی چنین رابطه‌ای به دست نیامد (۱۸).

بر اساس مطالعه‌ای دیگر در کره جنوبی، میزان آنژیوژن از سنجش MVD با نشانگرها (FasL) و Fas-ligand و عامل فون ویلبراند و مقدار VEGF در بافت مغز استخوان ۴۳ بیمار مبتلا به در لوسمی میلوبلاستیک حاد و همچنین ۱۸ نمونه طبیعی ارزیابی شد. مقدار MVD از میانگین نتایج در دو کانون داغ با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر میکروسکوپ گزارش گردید.

هر سه معیار به طور مشخصی در بیماران AML بالاتر از افراد گروه شاهد بود و با درمان، میزان آنها کاهش می‌یافتد. مقدار MVD با نشانگر عامل فون ویلبراند در بیماران AML و در گروه شاهد به ترتیب  $31/9 \pm 14/3$  و  $9/1 \pm 2/8$  و با نشانگر FasL به ترتیب  $27/2 \pm 55/1$  و  $10/3 \pm 12/8$  بود.

همان‌طور که در مقاله ذکر شده اعداد به دست آمده از دو نشانگر به کار رفته با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند. بر اساس مطالعه آنها رابطه‌ای بین میزان MVD و تعداد درصد بلاست مغز استخوان مشاهده گردید (۱۹) در صورتی که در مطالعه Padro چنین رابطه‌ای گزارش نشد (۱۷).

بر اساس مطالعه‌ای در چین میزان MVD در بیوپسی مغز استخوان در فیلد ۴۰۰ برابر میکروسکوپی، همین‌طور مقدار VEGF در مایع آسپیره مغز استخوان بررسی گردید. بر اساس نتایج آنها میزان MVD در بیماران (۲۲/۸۲) به طور مشخصی بیشتر از افراد گروه شاهد (۷/۱۷) بود. در هنگام رمیشن میزان MVD معادل ۸/۵۷ بود و در هنگام عود یا

## شورای محترم پژوهشی دانشگاه تشكیر می‌گردد.

همچنین از زحمات و همکاری بی‌دریغ کارکنان محترم بخش آسیب‌شناسی بیمارستان قائم (عج)، بویژه آفای مطهری و خانم برازنده که در تهیه و رنگ‌آمیزی لامها نهایت همکاری را داشته‌اند، قدردانی می‌گردد.

## تقدیر و تشکر

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی با عنوان "بررسی آنژیوژنر در لوسمی‌های حاد و مقایسه آن با بافت طبیعی مغز استخوان" است که با شماره ۸۴۳۵۶ از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به تصویب رسیده است؛ بدین وسیله از آن معاونت محترم و

## منابع:

- 1- Greer JP, Rodgers GM, Paraskevas F, Foerster J, Lukens JN, Glader B. Wintrob's Clinical Hematology. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004: p: 1916.
- 2- Hutchison RE, Abraham NZ. Leukocytic Disorders .In: McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21<sup>st</sup> ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2007.p: 565.
- 3- Ries LAG, Esiner MP , Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999. Bethesda, MD: National cancer institute, 2002; 1-23.
- 4- Ministry of Health & Medical Education, Center for disease control, Cancer Control Office: Iranian annual cancer registration report 2003. 2005; 2-3.
- 5- Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt H, Barlogie B: Angiogenesis in hematologic malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 2003; 45 (3): 227-44.
- 6- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease .7<sup>th</sup> ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2004. p: 309.
- 7- Guo J, Higashi K, Ueda Y, Oguchi M, Takegami T, Toga H, et al: Microvessel density: correlation with 18F-FDG uptake and prognostic impact in lung adenocarcinomas. J Nucl Med. 2006; 47 (3): 419-25.
- 8- Sadeghian MH, Sharifi N, Shakeri MT. Microvessel density in ductal carcinoma of breast and comparison with normal breast tissue. Iranian J Med Sci. 2006; 4 (8): 246-51.
- 9- Javadi P, Haeri H. Tumor angiogenesis in colorectal cancer, correlation with tumor extension and invasion. J Tehran Faculty of Med. 2001; 4 (59): 50-56.
- 10- Tavangar SM, Hojjati SR, Larijani B. The study of angiogenesis in malignant thyroid neoplasms with immunohistochemistry method. Iranian J Endocrinol Metabol. 2005; 27 (7): 213-16.
- 11- 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 (3): 815-21.
- 12- Rabitsch W, Sperr WR, Lechner K, Chott A, Prinz E, Valent P, et al. Bone marrow microvessel density and its prognostic significance in AML. Leuk Lymphoma. 2004; 45 (7): 1369-73.
- 13- Mesters RM, Padró T, Steins M, Bieker R, Retzlaff S, Kessler T, et al. Angiogenesis in patients with hematologic malignancies. Onkologie. 2001; 24 Suppl 5: 75-80.
- 14- Panteli K, Zagorianakou N, Bai M, Katsaraki A, Agnantis NJ, Bourantas K. Hematology:Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases detected by CD34 expression. Eur J Haematol. 2004; 72 (6): 410-15.
- 15- Kuzu I, Beksac M, Arat M, Celebi H, Elhan AH, Erekul S. Bone marrow microvessel density (MVD) in adult acute myeloid leukemia (AML): therapy induced changes and effects on survival. Leuk Lymphoma. 2004; 45 (6): 1185-90.
- 16- Wrobel T, Mazur G, Kapelko K, Kuliczkowski K. Endostatin serum level in acute myeloid leukemia. Neoplasma. 2005; 52 (2): 182-84.
- 17- Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of

- patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 95 (8): 2637-44.
- 18- Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia, *Blood*. 2000; 95 (1): 309-13.
- 19- Lee JJ, Chung IJ, Park MR, Ryang DW, Park CS, Kim HJ. Increased angiogenesis and Fas-ligand expression are independent processes in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2001; 25 (12): 1067-73.
- 20- Ye XJ, Wang LJ, Lin MF, Ding W. The clinical significance of angiogenesis in the bone marrow of acute leukemia patients. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2003; 42 (7): 486-89.
- 21- Steins MB, Bieker R, Padro T, Kessler T, Kienast J, Berdel WE, et al. Thalidomide for the treatment of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44 (9): 1489-93.

**Title:** Angiogenesis in acute leukemia and comparing it with normal bone marrow

**Authors:** MH. Sadeghian<sup>1</sup>, N. Sharifi<sup>2</sup>, H. Ayatollahi<sup>3</sup>, M. Khajeh Daloei<sup>4</sup>

**Abstract:**

**Background and Aim:** Angiogenesis is essential in the progression and metastasis of solid tumors. It has been proved that increase in angiogenesis within primary solid tumors is actually associated with nodal metastasis and risk prognosis of some malignancies. In contrast, regarding hematologic neoplasms very limited studies have been done. The goal of the present study was to determine MVD (Microvessel density) in acute leukemia and compare it with MVD in normal tissues.

**Materials and Methods:** In this study 30 cases with acute leukemia and 30 normal controls were selected. These had been diagnosed and archived in the pathology department of Mashhad Ghaem hospital .Their blocks and slides were prepared and examined. After their final approving, the paraffin blocks were thinly sliced and the slices were immunohistochemically stained for VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Immunohistochemical slides were evaluated for hot spots of MVD in the tissue in the microscopic field of vision with 400 times magnification.

**Results:** MVD or angiogenesis in acute leukemia was 20.2% which was obviously more than that in the controls (6.9%).The difference between the two groups was statistically significant ( $P<0.001$ ).

**Conclusion:** Angiogenesis in acute leukemia is significantly higher compared with the controls (who had normal tissues).But there was no significant difference between acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia.

**Key Words:** Acute Leukemia; Microvessel density (MVD); Immunohistochemistry; Angiogenesis

<sup>1</sup> Corresponding author, Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences (Cooperating in the Blood Bank and Serology Units). Mashhad, Iran sadeghianmh@mums.ac.ir

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Community Medicine, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran