

## بررسی آنژیوزنز در نئوپلاسم‌های بدخیم تیروئید با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی

دکتر سید محمد توانگر، دکتر سعیدرضا حاجتی، دکتر باقر لاریجانی

### چکیده

**مقدمه:** بدخیمی‌های تیروئید از جمله بدخیمی‌های شایع غدد درون‌ریز می‌باشد که نقش آنژیوزنز در آنها به خوبی مشخص نشده است و تحقیق بیشتر در این زمینه ضروری است. آنژیوزنز از عوامل لازم در رشد، بقا و گسترش بسیاری از سرطان‌هاست. هدف این مطالعه بررسی وجود یا عدم وجود آنژیوزنز در تومورهای بدخیم تیروئید و ارتباط آن با یافته‌های بالینی و میکروسکوپی است. **مواد و روش‌ها:** در یک مطالعه توصیفی، دوست و پنج نمونه از ضایعات بدخیم تیروئید مورد بررسی قرار گرفت و با روش ایمونوهیستوشیمی بر روی بلوک‌های پارافینی آنها رنگ‌آمیزی برای فاکتور هشت (F VIII) با استفاده از روش آویدین - بیوتین پراکسیداز انجام شد. تعداد عروق کوچک در هر مورد در سه نقطه که دارای عروق بیشتری بود شمارش شد و میانگین تعداد عروق در این نقاط تراکم عروق کوچک را برای هر مورد، مشخص می‌نمود. **یافته‌ها:** میانگین عروق کوچک در کارسینوم پاپیلری  $11/6 \pm 30/9$ ، در کارسینوم مدولاری  $20/4 \pm 35/7$ ، در کارسینوم فولیکولر  $16/0 \pm 29/5$  و در کارسینوم آناپلاستیک  $8/9 \pm 34/0$  بود که نشان‌دهنده این است که از نظر تعداد عروق کوچک در بین گروه‌های فوق ارتباط آماری معنی‌داری وجود ندارد ( $p=0/263$ ) **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آنژیوزنز در بین تومورهای بدخیم تیروئید که مورد بررسی قرار گرفتند تفاوت چندانی ندارد و همچنین ارتباط آماری معنی‌داری بین آنژیوزنز و یافته‌های میکروسکوپی (تهاجم کپسولی و تهاجم عروقی و درگیری غدد لنفاوی) وجود ندارد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که برخلاف بسیاری از سرطان‌های شایع، نقش آنژیوزنز در سرطان‌های تیروئید چندان مهم نیست و برای اثبات یا رد این موضوع نیاز به مطالعه بیشتری است.

**واژگان کلیدی:** آنژیوزنز، تیروئید، تومورهای بدخیم، ایمونوهیستوشیمی

دریافت مقاله: ۸۲/۱۱/۲۶ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۵/۵ - پذیرش مقاله: ۸۴/۵/۸

### مقدمه

پستان،<sup>۱</sup> پروستات، ریه و سرطان‌های سر و گردن<sup>۲</sup> به عنوان فاکتور مؤثر در پیش آگهی مطرح شده است و گاه در جهت کنترل سرطان از داروهای ضد آنژیوزنز استفاده می‌شود. مطالعات معدود انجام شده در زمینه نقش آنژیوزنز<sup>۲</sup> در سرطان‌های تیروئید که از جمله سرطان‌های شایع غدد

آنژیوزنز نقش کلیدی در رشد و گسترش و عود بسیاری از تومورهای توپر - و برخی انواع سرطان‌های خون دارد، همچنین در تعدادی از سرطان‌ها از جمله سرطان پوست،

درون‌ریز است، در بعضی مواقع نتایج متناقضی به همراه داشته است و به نظر می‌رسد با تحقیقات بیشتر و در صورت وجود آنژیوژنز در این ضایعات، در آینده بتوان با جلوگیری از آنژیوژنز توسط فاکتورهای آنتی‌آنژیوژنیک<sup>۴</sup> گام مؤثری در جلوگیری از پیشرفت یا احتمالاً در درمان این تومورها برداشت.

## مواد و روش‌ها

در یک مطالعه توصیفی، داده‌ها با استفاده از بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی تهران، از بیمارانی که به علت ابتلا به سرطان تیروئید در فاصله سال‌های ۱۳۷۲-۱۳۸۲ تیروئیدکتومی شده بودند، جمع‌آوری شد. بلوک‌های پارافینی در مورد چهار نوع از سرطان‌های تیروئید که بیشترین شیوع را دارند (کارسینوم پاپیلری، کارسینوم فولیکولار، کارسینوم مدولاری و کارسینوم آناپلاستیک) از بایگانی استخراج شد. بلوک پارافینی مناسب برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی (نمونه با حداقل نکروز و خونریزی و با فیکساسیون مناسب) انتخاب و با فاکتور VIII با استفاده از روش آویدین - بیوتین پراکسیداز رنگ‌آمیزی شد. در این روش از بلوک‌های پارافینی انتخاب شده ابتدا برش‌هایی با ضخامت چهار میکرومتر تهیه شد. این برش‌ها دیپارافینه و آب‌دهی شدند و به مدت پانزده دقیقه در آب اکسیژنه سی درصد قرار گرفتند. سپس شستشو با محلول سیترات انجام شد و آنگاه به مدت ۴ دقیقه در مایکروفر با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد آنتی‌بادی ضد فاکتور هشت با رقت ۱:۲۵ (DAKO Code No M616) اضافه و در حرارت اتاق به مدت پانزده دقیقه انکوبه گردید. پس از آن برش‌ها به روش LSAB به مرحله کروموژن (DAB) رسیدند.

روش ارزیابی بدین صورت بود که ابتدا اسلاید انتخاب شده از نمونه مناسب با بزرگ‌نمایی کم میکروسکوپ (Low power) مورد مطالعه قرار گرفت و در هر لام سه نقطه که دارای عروق بیشتری بود نقاط داغ<sup>۱</sup> این اصطلاح در بررسی آنژیوژنز، به نقاطی از لام اطلاق می‌گردد که در بررسی با بزرگ‌نمایی کم میکروسکوپ دارای تعداد عروق خونی زیادی باشند. مشخص شده، سپس تعداد عروق کوچک در این نقاط در بزرگ‌نمایی بالای میکروسکوپ شمارش شده، میانگین آنها محاسبه گردید. عدد به دست آمده بیانگر تعداد عروق کوچک در این مورد خاص بود. هر سلول اندوتلیال تا

تجمعی از آنها با یا بدون لومن به عنوان یک رگ کوچک<sup>ii</sup> محاسبه شد. لازم به ذکر است تنها رگ‌های کوچک موجود در تومور (و نه رگ‌های موجود در بافت طبیعی مجاور تومور) شمارش شدند.

در این بررسی، تعداد کل نمونه‌ها ۲۰۵ بلوک پارافینی شامل ۱۳۹ مورد کارسینوم پاپیلری (۶۷/۸٪)، ۳۲ مورد کارسینوم مدولاری (۱۵/۶٪) ۲۴ مورد کارسینوم فولیکولر (۱۱/۷٪) و ۱۰ مورد کارسینوم آناپلاستیک (۴/۹٪) بود. تمامی موارد مجدداً بازبینی شدند و در صورت لزوم به جهت اطمینان در تشخیص با روش‌های دیگر از جمله ایمونوهیستوشیمی (مثلاً در موارد کارسینوم مدولاری) مورد تأیید قرار گرفتند.

## یافته‌ها

۷۶٪ نمونه‌ها مربوط به زنان با متوسط سنی ۳۳ سال و ۲۴٪ مربوط به مردان با متوسط سنی ۳۷ سال بود. بین گروه‌های سنی مختلف و میزان آنژیوژنز ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بین زنان و مردان از نظر میانگین عروق کوچک تفاوت محسوسی وجود نداشت. از نظر تراکم عروق کوچک<sup>iii</sup> (MVD) در بین چهار گروه<sup>iv</sup> بدخیمی مطالعه شده رابطه معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد. ۱۳٪ از ضایعات دارای تهاجم عروقی، ۱۷٪ از ضایعات دارای تهاجم کپسولی و ۱۷٪ از ضایعات دارای درگیری غدد لنفاوی بودند. ارتباط آماری بین درجه آنژیوژنز<sup>v</sup> و تهاجم عروقی، تهاجم کپسولی و درگیری غدد لنفاوی در بدخیمی‌های بررسی شده تیروئید در این مطالعه وجود نداشت (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱ - فراوانی تومورهای بدخیم تیروئید مورد مطالعه

تعداد	درصد	
۱۳۹	۶۷/۸	کارسینوم پاپیلری
۳۲	۱۵/۶	کارسینوم مدولاری
۲۴	۱۱/۷	کارسینوم فولیکولر
۱۰	۴/۹	کارسینوم آناپلاستیک
۲۰۵	۱۰۰/۰	جمع

ii- Microvessel

iii- Mirovessel density

iv- Between groups

v- Angiogenesis degree

i- Hot spots

جدول ۲- میانگین تراکم عروق کوچک (mirovessel density) در تومورهای بدخیم تیروئید بررسی شده

تعداد	میانگین (انحراف معیار)	خطای استاندارد	فاصله اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		کارسینوم پاپیلری
			حد پائین	حد بالا	
۱۳۹	۳۰/۹ (۱۱/۶)	۰/۹	۲۹/۰	۳۲/۹	کارسینوم مدولاری
۳۲	۳۵/۷ (۲۰/۴)	۳/۶	۲۸/۳	۴۳/۱	کارسینوم فولیکولر
۲۴	۲۹/۵ (۱۶/۰)	۳/۲	۲۲/۷	۳۶/۳	کارسینوم آناپلاستیک
۱۰	۳۴/۰ (۸/۹)	۲/۸	۲۷/۶	۴۰/۴	جمع
۲۰۵	۳۱/۶ (۱۳/۸)	۰/۹	۲۹/۷	۳۳/۵	

### بحث

هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان آنژیوژنز در تومورهای بدخیم تیروئید و مقایسه آنها با یکدیگر بود. همچنین بررسی ارتباط احتمالی آنژیوژنز در ضایعات بدخیم تیروئید با پارامترهای دیگر از جمله تهاجم به کپسول و عروق خونی و درگیری غدد لنفاوی و مقایسه شیوع آنژیوژنز در دو جنس مد نظر بود.

در این مطالعه رابطه آماری معنی‌داری از نظر شیوع آنژیوژنز بین تومورهای بدخیم تیروئید وجود نداشت که بیانگر عدم نقش آنژیوژنز به عنوان یک عامل تعیین کننده پیش‌آگهی بود

مطالعات معدودی در زمین، نقش تراکم عروق کوچک در کارسینوم تیروئید انجام شده که نتایج یکسانی نیز نداشته است. از جمله بررسی داهر و همکاران که نشان می‌دهد با وجود ارتباط تراکم عروق و پیش‌آگهی در تومورهای پستان، معده و کولون، نقش MVD در کارسینوم تیروئید با نتایج نامشابه همراه بوده است.<sup>۱</sup> در تعدادی از بررسی‌ها بر نقش احتمالی MVD به عنوان عامل پروگنوستیک در کارسینوم تمایز یافته تیروئید تأکید شده است.<sup>۱،۲</sup>

نتیجه مطالعه فونتانی و همکاران بیانگر این موضوع است که MVD نشان‌دهنده پیش‌آگهی بد در کارسینوم مدولاری تیروئید و نه در انواع دیگر کارسینوم تیروئید است.<sup>۲</sup> در دو مطالعه دیگر که اولی به روش ایمونوهیستوشیمی بر روی ۱۵ نمونه تیروئید از کارسینوم فولیکولر و دومی نیز با همین روش بر روی ۳۴ نمونه کارسینوم فولیکولر انجام شد، مشاهده شد که کارسینوم فولیکولر تیروئید که فقط تهاجم کپسولی داشته باشد (بدون تهاجم عروقی)، متاستاز نمی‌دهد.<sup>۴-۷</sup> در بررسی فان‌هیردن و

همکاران به روش ایمونوهیستوشیمی مشاهده شد که کارسینوم فولیکولر تیروئید با تهاجم کپسولی به تنهایی و بدون تهاجم به رگ یک بدخیمی تهدیدکننده نیست.<sup>۸</sup> در مطالعه‌ای که بر روی کارسینوم پاپیلر تیروئید انجام شد، نتیجه بدین صورت بود که آنژیوژنز به عنوان یک عامل تعیین کننده پیش‌آگهی محسوب نمی‌شود.<sup>۹</sup> در مطالعه درینگر و همکاران به روش ایمونوهیستوشیمی بر روی لنفوم غده تیروئید مشاهده شد که تهاجم عروقی در این بدخیمی، پیش‌آگهی را بدتر می‌کند.<sup>۱۰</sup> در بررسی وونگ و همکاران رابطه‌ای بین واسکولاریته تومور و پیش‌آگهی در کارسینوم فولیکولر و کارسینوم پاپیلر تیروئید یافت نشده است.<sup>۱۱</sup> در مطالعه گلدنبرگ و همکاران ارتباط قابل توجهی بین افزایش تراکم عروق کوچک و هیستولوژی تومور دیده نشده است،<sup>۱۲</sup> گرچه آنژیوژنز نقش بسیار مهمی در گسترش، عود و متاستاز بسیاری از سرطان‌ها دارد.

نتایج این مطالعه و تعدادی از تحقیقات دیگر<sup>۱۱،۱۲</sup> بیانگر این نکته است که شیوع آنژیوژنز در بین تومورهای بدخیم تیروئید ارتباطی به نوع هیستولوژیک تومور ندارد و به نظر می‌رسد نمی‌توان از آن به عنوان یک عامل مهم در پیگیری بیماران استفاده نمود. مطالعات دیگر بیانگر این است که حتی با وجود نقایص ژنتیک که رشد یک سلول منفرد را از تنظیم خارج می‌کند، تومورها نمی‌توانند بیش از یک تا دو میلی‌متر به رشد خود ادامه دهند مگر اینکه عروق خونی آنها کافی باشد.<sup>۷،۱۳</sup> با توجه به نقش مهم آنژیوژنز در رشد، تکامل و گسترش سلول‌های توموری و اهمیت آن در بسیاری از سرطان‌های مهم بدن، مطالعه مذکور ارتباط معنی‌داری بین انواع متفاوت سرطان‌های تیروئید و همچنین نوع سرطان با یافته‌های بالینی و میکروسکوپی نشان نمی‌دهد و به نظر می‌رسد که در جهت اثبات یا رد نقش آنژیوژنز در این

بخش پاتولوژی بیمارستان دکتر شریعتی تهران - بخش ایمنو هیستوشیمی خانم عظیمی و خانم امیرانی که در انجام این تحقیق ما را یاری رساندند، قدردانی می‌گردد.

تومورها و استفاده احتمالی درمانی از آن، مطالعات تکمیلی لازم است.

## سپاسگزاری

از همکاری جناب آقای دکتر حشمت در زمینه آنالیز آماری طرح و نیز از همکاری ارزنده و صمیمانه پرسنل

## References

1. Dhar DK, Kubota H, Kotoh T, Tabara H, Watanabe R, Tachibana M, et al. Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg*. 1998;176(5):442-7.
2. Ishiwata T, Iino Y, Takei H, Oyama T, Morishita Y. Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 1998;5(6):1343-8.
3. Fontanini G, Vignati S, Pacini F, Pollina L, Basolo F. Microvessel count: an indicator of poor outcome in medullary thyroid carcinoma but not in other types of thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 1996;9(6):636-41.
4. Goldstein NS, Czako P, Neill JS. Metastatic minimally invasive (encapsulated) follicular and Hurthle cell thyroid carcinoma: a study of 34 patients. *Mod Pathol*. 2000;13(2):123-30.
5. Segal K, Shpitzer T, Feinmesser M, Stern Y, Feinmesser R. Angiogenesis in follicular tumors of the thyroid. *J Surg Oncol*. 1996;63(2):95-8.
6. Segal K, Arad A, Lubin E, Shpitzer T, Hadar T, Feinmesser R. Follicular carcinoma of the thyroid. *Head Neck*. 1994;16(6):533-8.
7. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
8. van Heerden JA, Hay ID, Goellner JR, Salomao D, Ebersold JR, Bergstralh EJ, et al. Follicular thyroid carcinoma with capsular invasion alone: a nonthreatening malignancy. *Surgery*. 1992;112(6):1130-6.
9. Akslen LA, Livolsi VA. Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum Pathol*. 2000;31(4):439-42.
10. Derringer GA, Thompson LD, Frommelt RA, Bijwaard KE, Heffess CS, Abbondanzo SL. Malignant lymphoma of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 108 cases. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(5):623-39.
11. Wong NA, Willott J, Kendall MJ, Sheffield EA. Measurement of vascularity as a diagnostic and prognostic tool for well differentiated thyroid tumours: comparison of different methods of assessing vascularity. *J Clin Pathol*. 1999 Aug;52(8):593-7.
12. Wong N, Willott J, Kendall M, et al. Measurement of vascularity as a diagnostic and prognostic tool for well differentiated thyroid tumors. *J Clin Pathol* 1999;52:593-597.
13. Goldenberg JD, Portugal LG, Wenig BL, Ferrer K, Wu JC, Sabnani J. Well-differentiated thyroid carcinomas: p53 mutation status and microvessel density. *Head Neck*. 1998;20(2):152-8.
14. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.