

## بررسی اثر داروی تالیدومید بر فیروز ریه ناشی از بلئومایسین در مدل حیوانی رات

دکتر شهرام رفیعیان\*، دکتر سید علی علوی\*، دکتر نوشین میرخشتی\*،  
دکتر عاطفه صادقی زاده\*

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲

تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۸

\*پزشک عمومی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق، شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران.

### چکیده

مطالعات نشان می‌دهد که فرآیند آنژیوژنز در بیماری فیروز ریوی دخیل بوده، همراه با تغییرات عروقی در بافت‌ها و سطح سیتوکین‌ها می‌باشد. تالیدومید دارویی است که باعث آسیب وسیع اندوتلیال و تغییر در سطح  $TNF-\alpha$  و VEGF می‌گردد. لذا در مطالعه‌ی حاضر اثر این دارو را در مدل حیوانی فیروز ریه‌ی القا شده با بلئومایسین بررسی نمودیم.

مقدمه:

۱۸ رات مورد مطالعه به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند: ۱) گروه مداخله: که بلئومایسین داخل تراشه‌ای و تالیدومید داخل صفاقی دریافت کردند، ۲) گروه شاهد مثبت (بلئومایسین) و ۳) گروه شاهد منفی (تزریق داخل تراشه‌ی نرمال سالین). پس از یک‌ماه، بافت ریه‌ی آنها جهت بررسی فیروز به روش اندازه‌گیری کمی هیدروکسی پرولین و همچنین اندازه‌گیری رگ‌زایی با شمارش تعداد عروق زیر میکروسکوپ، خارج گردید. با استفاده از نرم‌افزار MATLAB6 نیز درصد فضای آلوئولی در لام‌ها به‌عنوان اندکس ظرفیت کل ریوی (TLC) تعیین شد.

روش‌ها:

بین گروه‌های شاهد منفی و مثبت و همچنین گروه مداخله و شاهد منفی، اختلاف معنی‌داری در مقدار کمی کلاژن وجود داشت، ولی در مقایسه‌ی گروه‌های شاهد مثبت و مداخله، تفاوت معنی‌داری یافت نشد. میانگین تعداد عروق و درصد فضای آلوئولی در لام‌های مربوط به ۳ گروه تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد. تالیدومید در روند آنژیوژنز و به طبع آن فیروز ریوی در گروه مداخله اثری نداشته است. علاوه بر این تالیدومید با مکانیسم ناشناخته، باعث درگیری ریوی مشابه پاتولوژی IPF می‌شود. لذا بررسی‌های بیشتر و با دوزهای متفاوت و در ترکیب با داروهای دیگر، برای شناخت آثار آنتی‌آنژیوژنیک آن مفید به نظر می‌رسد.

یافته‌ها:

نتیجه‌گیری:

فیروز ریه، تالیدومید، بلئومایسین، آنژیوژنز

واژگان کلیدی:

تعداد صفحات: ۶  
تعداد جدول‌ها: -  
تعداد نمودارها: -  
تعداد منابع: ۱۴

نوشین میرخشتی، پزشک عمومی، شرکت تحقیقاتی حکیمان شرق، شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان، اصفهان، ایران.  
E-mail: nooshinmirkheshti@gmail.com

آدرس نویسنده مسئول:

## مقدمه

آنژیوزنز (رگ‌زایی) شامل رشد عروق کوچک جدید از عروق قبلی است که هم در فرآیندهای فیزیولوژیک نظیر رشد و ترمیم و هم در حالات پاتولوژیک مانند سرطان، بیماری‌های التهابی مزمن ریه و مواردی از این دست نقش دارد (۱). در فرآیند آنژیوزنز فاکتورهای پیش‌التهابی تولید می‌شود، به طوری که بیان مولکول‌های چسبنده (Adhesion Molecules) نظیر سلکتین‌ها و انتی‌گیرین‌ها، در عروق جدید زیاده‌تر و این عروق به مولکول‌های مولد التهاب حساس‌تر می‌شوند (۲).

بیماری فیروز دهنده‌ی ایدیوپاتیک ریوی (Idiopathic pulmonary fibrosis) از بیماری‌های مزمن و کشنده‌ای است که درمان قطعی برای آن وجود ندارد (۳). اهمیت آنژیوزنز در پیشرفت فیروز در IPF در مقالات مختلف بررسی شده است، بدین صورت که در بررسی بافت ریه بیماران مبتلا به IPF (۴) و فیروز ریوی القاء شده با بلئومایسین در رات‌ها (۵) نئوواسکولاریزاسیون و آناس-توموز می‌مان میکروواسکولارهای ریوی و سیستمیک و همچنین شواهدی از تغییرات شدید عروقی در مناطق فیروز دیده شده است.

با توجه به مدیاتورهای دخیل در فرآیند آنژیوزنز فیروز ریوی، استفاده از داروهای آنژیواستاتیک می‌تواند در درمان این بیماری مفید باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که داروی تالیدومید دارای خاصیت آنژیواستاتیک می‌باشد (۶)، به طوری که به عنوان vascular target باعث مرگ وسیع سلول‌های اندوتلیال و آسیب عملکرد عروقی و ایجاد تجمع رگ‌ها می‌شود (۶). با توجه به اثرات این دارو و اهمیت آنژیوزنز در پاتوفیزیولوژی فیروز ریوی، در این مطالعه، اثر این دارو را در مدل

حیوانی فیروز ریه، القاء شده با بلئومایسین بررسی نمودیم.

## روش‌ها

رات‌هایی با نژاد Vistar با وزن  $20 \pm 230$ ، از انستیتو پاستور تهران تهیه و مجوز جهت رعایت موازین اخلاقی کار با رات‌ها، از مراجع ذی‌ربط در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان اخذ شد. سپس سه گروه ۶ تایی به صورت: (۱) گروه مداخله، (۲) گروه شاهد مثبت و (۳) گروه شاهد منفی انتخاب شدند. رات‌ها با کتامین لیدوکائین به ترتیب به مقدار  $100 \text{ mg/kg}$  و  $5 \text{ mg/kg}$ ، بیهوش شدند و پس از حذف موهای ناحیه‌ی جلوی گردن، برش عمودی به طول ۲ سانتی‌متر در این ناحیه زده شد. پس از کنار زدن بافت‌های قدام‌نای، به گروه‌های مداخله و شاهد مثبت، محلول بلئومایسین در نرمال سالین به مقدار  $4/5 \text{ mg/kg}$  توسط سرنگ انسولین داخل‌نای تزریق شد. سپس پوست این ناحیه با استفاده از نخ سیلک ۳ صفر بخیه زده شد. به همین روش به گروه شاهد منفی، نرمال سالین داخل‌تراشه‌ای تزریق شد. ۱۵ دقیقه پس از تزریق بلئومایسین به گروه مداخله، پودر تالیدومید با دوز  $200 \text{ mg/kg}$  به صورت امولسیون در محلول Tween-80 در بافر فسفات به روش داخل صفاقی ۵ روز در هفته به مدت یک ماه به رات‌ها تزریق شد (۸). به گروه شاهد مثبت نیز محلول Tween-80 در بافر فسفات به‌عنوان دارونما به روش داخل صفاقی ۵ روز در هفته به مدت یک‌ماه تزریق شد. پس از یک‌ماه، جهت تهیه‌ی نمونه‌ی بافتی و اندازه‌گیری کمی کلاژن، موش‌ها با دوز بالاتر از بیهوشی با کتامین کشته شدند. ریه‌ی چپ جهت آزمون بررسی مقدار کلاژن (هیدروکسی پرولین) و ریه‌ی

بود: گروه شاهد منفی:  $53/11 \pm 30.1$  mg/g، گروه شاهد مثبت:  $44/08 \pm 395/5$  mg/g و گروه مداخله:  $27/17 \pm 432/33$  mg/g. اختلاف بین گروه‌های شاهد منفی و مثبت و همچنین گروه مداخله و شاهد منفی معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). ولی در مقایسه‌ی گروه‌های شاهد مثبت و مداخله تفاوت معنی‌داری یافت نشد ( $P = 0/324$ ).

میانگین ( $\pm$  SD) تعداد عروق در لام‌های سه گروه به قرار زیر بود:

گروه مداخله:  $17/49 \pm 67/5$ ، گروه شاهد مثبت:  $38/9 \pm 71/5$  و گروه شاهد منفی:  $15/26 \pm 43/81$ . با استفاده از تست‌های آماری تفاوت بین سه گروه معنی‌دار نبود ( $P = 0/225$ ).

میانگین درصد فضای آلوئولی در گروه مداخله معادل  $1/8 \pm 64/52$  درصد، در گروه شاهد مثبت،  $4/43 \pm 66/89$  درصد و در گروه شاهد منفی،  $3/22 \pm 68/45$  درصد بود. تفاوت بین سه گروه معنی‌دار نبود ( $P = 0/324$ ).

### بحث

نتایج حاصل از مطالعه، نشان می‌دهد که تالیدومید بر روند آنژیوژنز در فیبروز ریوی رات‌های القاء شده با بلئومایسین اثری ندارد. علاوه بر این تزریق داخل تراشه‌ای بلئومایسین در گروه‌های شاهد مثبت و گروه مداخله باعث القای فیبروز ریوی شده بود، ولی تزریق داخل صفاقی تالیدومید در گروه مداخله نسبت به گروه شاهد منفی و مثبت باعث تغییر در مقدار آنژیوژنز بافت ریوی نگردید.

در پاتولوژی IPF نشان داده شده است که عدم تنظیم و ترمیم غیرطبیعی بافت ریه با آنژیوژنز تسریع شده و همچنین فیبروپرولیفراسیون و تغییر ماتریکس

راست جهت آزمون‌های بافت‌شناسی آماده سازی شد. مقدار کمی کلاژن به عنوان معیار بررسی فیبروز ریوی به روش Woessner (9) اندازه‌گیری و در نهایت داده‌ها به صورت هیدروکسی پرولین در واحد وزن ریه (mg/g) آورده شد. اندازه‌گیری نرم‌افزاری شاخص فیبروز با استفاده از نرم‌افزار MATLAB6 در 5 فیلد از لام‌ها با بزرگ‌نمایی 100، انجام شد. در این روش درصد فضای آلوئولی به عنوان اندکس ظرفیت کل ریوی (Total Lung Capacity یا TLC) اندازه‌گیری گشته و سپس میانگین آن برای هر یک از لام‌ها تعیین و در سه گروه مقایسه شد.

علاوه بر این جهت بررسی آنژیوژنز از رنگ‌آمیزی فون ویلبراند استفاده شد و در نهایت به منظور اندازه‌گیری آنژیوژنز در لام‌ها میکروسکوپ نوری به کار رفت. بدین ترتیب که تعداد عروق در 5 فیلد با بزرگ‌نمایی 100 در هر لام شمرده و میانگین آن ثبت شد. سپس تعداد عروق در گروه‌های مختلف بررسی شد (10).

در نهایت آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی 13 (version 13; SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون آماری ANOVA انجام شد. علاوه بر این، جهت تعیین اختلاف بین گروه‌ها از آزمون Tukey-HSD post hoc استفاده گردید. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش و P-value کمتر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

مقادیر کمی هیدروکسی پرولین در واحد وزن ریه (mg/g) در هر نمونه بعد از تبدیل مقدار جذب نور هر یک از آن‌ها با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد که میانگین ( $\pm$  SD) این مقدار، در سه گروه به قرار زیر

علائم تنفسی به صورت سرفه و دیسپنه به همراه داشته که در نمای رادیوگرافیک تغییرات به نفع فیبروز ریه بوده است (۱۳).

با توجه به نتایج مطالعات قبلی و بررسی حاضر، هرچند به نظر تالیدومید در سطح مولکولی باعث مهار روند التهاب و فاکتورهای آنژیوژنز می‌شود ولی ممکن است با مکانیسم‌های ناشناخته‌ی دیگر و از سایر روندهای القای فیبروز، عوارض ریوی مشابه پاتولوژی IPF ایجاد نماید که در کل در روند فیبروز ریوی (IPF) در سطح بالینی مناسب نیست.

شایان ذکر است، نتایج مطالعه‌ی حاضر مغایر با نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی Tabata و همکاران در مورد تأثیر تالیدومید در درمان فیبروز ریوی القاء شده با بلئومایسین در مدل حیوانی می‌باشد (۱۴). در مطالعه‌ی مذکور از فرم داخل صفاقی بلئومایسین جهت ایجاد فیبروز ریوی استفاده شده است. استفاده‌ی هم‌زمان از بلئومایسین و تالیدومید به صورت داخل صفاقی می‌تواند مانع اثر کامل بلئومایسین بر روی بافت‌های بدن به ویژه ریه گشته، در نتیجه اختلاف مشاهده شده به دنبال استفاده از تالیدومید ناشی از کاهش اثر بلئومایسین در داخل صفاق و جذب بافتی کمتر آن باشد. با این حال با توجه به مطالب ضد و نقیض موجود در این رابطه، بررسی‌های بیشتر با استفاده از دوزهای متفاوت و یا حتی در ترکیب با سایر داروها می‌تواند اطلاعات کامل‌تری در این حیطه فراهم نماید.

خارج سلولی باعث ایجاد فیبروز پیش رونده و کاهش عملکرد ریوی می‌شود. علاوه بر این تغییرات عروقی مشاهده شده در بافت ریه‌ی رات‌های القاء شده با بلئومایسین به قرار زیر بوده است (۵):

(۱) تغییرات جدید در شبکه‌ی عروقی اطراف برونش‌ها  
(۲) تغییر در ساختار کاپیلارهای آلوئول

با توجه به مکانیسم‌های متعدد و تغییرات عروقی زیاد در روند ایجاد IPF به نظر می‌رسد، استفاده از تالیدومید به تنهایی و با توجه به عدم شناخت مکانیسم دقیق آن کافی نباشد. به طوری که در مطالعات درمانی مشابه مشخص شده است که خنثی کردن CXC سیتوکین‌ها و یا استفاده از فرم نوترکیب IP-10 به تنهایی باعث قطع کامل روند فیبروز در IPF نشده و تنها با کاهش روند آنژیوژنز روند فیبروز را کاهش می‌دهد ولی کلاژن‌سازی با استفاده از فیبروبلاست‌ها و حضور فاکتورهای التهابی همراه با القای سنتز ماتریکس خارج سلولی ادامه دارد (۱۱).

در مطالعات قبلی، اثرات تالیدومید بر آسیب سلول‌های اندوتلیال (۱۰) و یا در سطح مولکولی کاهش TNF- $\alpha$  و سیتوکین‌ها و VEGF (۱۲) به اثبات رسیده است. به طوری که اثر تراژون آن را ثانویه به مهار آنژیوژنز در رشد جوانه‌ی اندام‌های جنین می‌دانند و مصرف خوراکی تالیدومید در خرگوش‌ها با مهار bFGF باعث جلوگیری از آنژیوژنز در قرنیه‌ی آنها شده است (۱۲). این در حالی است که استفاده از این دارو در درمان مولتیپل میلوما در بیماران ۶۵ ساله،

## References

- Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J. Harrison's principles of internal medicine. 15<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Professional Publishing; 2001. pp. 517-30
- Walsh DA, Pearson CI. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* 2001; 3(3): 147-53.
- du Bois RM. Diffuse lung disease: a view for the future. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1997; 14(1): 23-30.

4. Turner-Warwick M. Precapillary systemic-pulmonary anastomoses. *Thorax* 1963; 18: 225-37.
5. Peao MN, Aguas AP, de Sa CM, Grande NR. Neoformation of blood vessels in association with rat lung fibrosis induced by bleomycin. *Anat Rec* 1994; 238(1): 57-67.
6. Ng SS, Brown M, Figg WD. Thalidomide, an antiangiogenic agent with clinical activity in cancer. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(4): 194-9.
7. Denekamp J, Dasu A, Waites A. Vasculature and microenvironmental gradients: the missing links in novel approaches to cancer therapy? *Adv Enzyme Regul* 1998; 38: 281-99.
8. Ruddy JM, Majumdar SK. Antitumorigenic Evaluation of Thalidomide Alone and in Combination with Cisplatin in DBA2/J Mice. *J Biomed Biotechnol* 2002; 2(1): 7-13.
9. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93: 440-7.
10. Byrne GJ, Bundred NJ. Surrogate markers of tumoral angiogenesis. *Int J Biol Markers* 2000; 15(4): 334-9.
11. Keane MP, Belperio JA, Arenberg DA, Burdick MD, Xu ZJ, Xue YY, et al. IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol* 1999; 163(10): 5686-92.
12. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(9): 4082-5.
13. Carrion VF, Bertomeu-Gonzalez V. Lung toxicity due to thalidomide. *Arch Bronconeumol* 2002; 38(10): 492-4.
14. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, et al. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol* 2007; 179(1): 708-14.

Received: 2008.3.8  
Accepted: 2008.8.23

## The Effect of Thalidomide on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats

Shahram Rafieian MD\*, Sayyed Ali Alavi MD\*,  
Nooshin Mirkheshti MD\*, Atefeh Sadeghizadeh MD\*

\* General Practitioner, Hakimian-e- Shargh Research Company, Isfahan Science and Research Region, Isfahan, Iran.

<b>Background:</b>	<b>Abstract</b> Current evidences suggest that the change in cytokine level by induction of angiogenesis may play a key role in the development of lung fibrosis. It seems, thalidomide by the destruction of endothelial cells and changing TNF- $\alpha$ level could be helpful in antiangiogenic therapies. The present study examined the effect of thalidomide on bleomycin-induced lung fibrosis in rats.
<b>Methods:</b>	18 rats were divided into three groups: (group 1) negative control group, which received normal saline intratracheally, (group 2) positive control group in which bleomycin was intratracheally injected, (3) intervention group which received thalidomide and bleomycin. Lung tissue was extracted after one month of treatment. Collagen content (as fibrosis index) and angiogenesis were indicated by Woessner method and Von Wilbrand staining, respectively. Total Lung Capacity index, was determined by MATLAB software.
<b>Findings:</b>	Collagen content had significant difference between positive and negative control groups, but there was no difference between positive control and experimental group. There was no significant difference between groups for angiogenesis and Total Lung Capacity index.
<b>Conclusion:</b>	Thalidomide had no effect on bleomycin induced pulmonary fibrosis. Otherwise, the findings of the study provide this evidence that thalidomide may induce pulmonary injury that is pathologically looks like IPF. So, more studies with some other angiostatic drugs and different doses are needed.
<b>Key words:</b>	<b>Pulmonary fibrosis, Thalidomide, Bleomycin, Angiogenesis.</b>
<b>Page count:</b>	6
<b>Tables:</b>	-
<b>Figures:</b>	-
<b>References:</b>	14
<b>Address of Correspondence:</b>	Nooshin Mirkheshti MD, General Practitioner, Hakimian-e- Shargh Research Company, Isfahan, Iran. E-mail: nooshinmirkheshti@gmail.com