

## ایجاد مدل زئوگرافت بومی تومور ویلمز در ایران و کاربردهای آن در توسعه مطالعات پیش بالینی

**دکتر احد محمدنژاد:** دستیار فوق دکترای تحقیقاتی پاتولوژی سرطان، مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mohamadnadjad@yahoo.com

**دکتر عبدالمحمد کجیاف زاده:** استاد و فوق تخصص جراحی ارولوژی اطفال، مرکز تحقیقات اورولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. kajbafzd@sinatums.ac.ir

**دکتر محمدجواد محسنی:** پزشک عمومی، مرکز تحقیقات ارولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mjmohseni@hotmail.com

**دکتر صمد محمدنژاد:** متخصص فارماکولوژی، مرکز تحقیقات تصویربرداری سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. smuhammadnejad@gmail.com

**دکتر محمدعلی عقابیان:** استاد و متخصص فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات تصویربرداری سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. oghabian@sina.tums.ac.ir

**دکتر فرخ تیرگری:** استاد و متخصص پاتولوژی، مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ftirgari@sina.tums.ac.ir

**دکتر محمد واسعی:** استاد و متخصص پاتولوژی، مرکز تحقیقات ارولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. vasei@tums.ac.ir

**مهناز حدادی:** کارشناس ارشد آزمایشگاه، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان انستیتو کانسر ایران، تهران، ایران. mahnaz1464@yahoo.com

**دکتر ساناز ریسمانچی:** دکترای عمومی، مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. S.rismanchi88@gmail.com

**\*دکتر سعید امانپور:** دانشیار و متخصص جراحی دامپزشکی، مرکز تحقیقات مدل‌های سرطان انستیتو کانسر ایران، آزمایشگاه سرطان های تجربی، تهران، ایران (\*نویسنده مسئول). saeidamanpour@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** تومور ویلمز (نوروبلاستوما) یک نئوپلازی رویانی با منشاء بلاستمای نفروژنیک بوده و مهم ترین تومور کلیوی کودکان محسوب می گردد. در مواردی با نمای بافتی نامطلوب و هم چنین عود تومور، شناس بقاء کاهش می یابد. هم چنین عوارض دیررس ناشی از شیمی درمانی، جان شفا یافتگان تومور ویلمز را تهدید می کند. هدف این مطالعه، ایجاد مدل زئوگرافت بافت توموری مشتق شده از بیمار بوده تا بتوان با این مدل‌ها، آزمون‌های مقاومت به داروهای شیمی درمانی را در هر فرد مورد ارزیابی قرار داد.

**روش کار:** چهار بیمار مبتلاء به تومور ویلمز را انتخاب و نمونه تازه جراحی را به آزمایشگاه منتقل و پس از گذراندن مراحل کشت اولیه سلول های توموری و خلص سازی آن‌ها، به ازای هر تومور، به ۱۰ سر موش بی موی فاقد تیموس به صورت زیر جلدی تلقیح گردیدند. سپس مراحل رشد آن‌ها ارزیابی شده و تومورها با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** میزان تومورزایی در مدل زئوگرافتی تا ۷۰٪ گزارش گردید. هم چنین نتایج آسیب شناسی نشان داد که در اسلایدهای H&E، هر سه بخش اپیتلیالی، استرومایی و بلاستما وجود داشته و نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز با مارکرهای CK، Desmin، Myogenin، WT-1 و Vimentin، نوروبلاستما را تأیید کردند.

**نتیجه گیری:** بررسی های هیستوپاتولوژیکی، اعتباربخشی به مدل زئوگرافت تومور ویلمز را مورد تأیید قرار داد. با توجه به این که این مدل برای اولین بار در ایران انجام پذیرفته است، از این رو می تواند پژوهشگران را به مطالعات درم آن‌ها ی انفرادی نوروبلاستوما و هم چنین ارزیابی آزمون‌های مقاومت تومور نسبت به داروهای شیمی درمانی رهنمون سازد.

**کلیدواژه‌ها:** تومور ویلمز، مدل زئوگرافت، اعتباربخشی

### مقدمه

بین ۲ تا ۵ سالگی بوده و از نظر جنسیت چندان تفاوتی بین دختران و پسران وجود ندارد (۳). در سالیان اخیر استراتژی های نوین درمانی سبب شده اند که میزان بقاء کلی (Overall survival rate) بیماران به بالای ۹۰٪ برسد. با این حال در موارد عود مجدد و یا نوع بافتی با نمای نامطلوب (Unfavorable)، پیش آگهی هنوز ضعیف است

تومور ویلمز (نوروبلاستوما) یک نئوپلازی رویانی با منشاء بلاستمای نفروژنیک بوده و مهم ترین تومور کلیوی کودکان محسوب می شود. این بیماری در بیشتر موارد به صورت اسپورادیک ظاهر شده و تنها ۲٪ از تومورهای ویلمز را نوع ارثی آن تشکیل می دهد (۱-۲). اوج شیوع سنی این تومور

نیست. اما پاره ای از مطالعات نشان می دهند که این میزان، شبیه بسیاری از کشورهای در حال توسعه بوده و میزان بقا نسبت به سال های قبل بهتر شده است، اما هنوز با کشورهای توسعه یافته فاصله ای وجود دارد (۱۷).

امروزه تحقیقات پایه ای سرطان که از قابلیت ترجمه ای و تعمیم پذیری (Translational Research) بالایی برخوردارند، بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است. چنین مطالعاتی در تومور ویلمز می تواند آینده را به نفع بیماران رقم بزند. نکته اساسی که درمان نوروبلاستوما را با چالش جدی مواجه می نماید، عوارض دیررس ناشی از درمان است. زیرا در بسیاری از موارد مشاهده شده که شفا یافتگان تومور ویلمز، به علت عوارض دیررس درمانی، با سرطان های ثانویه و هم چنین با اختلالات قلبی - تنفسی و کلیوی مراجعه نموده اند (۱۸). این امر می تواند پژوهشگران را به استفاده از درمان های نوین و هدفمند جهت درمان با کمترین عوارض، رهنمون سازد.

در حال حاضر مدل های زئوگرافت تومورها که با استفاده از موش های بی موی فاقد تیموس (Athymic nude mice) ایجاد می گردند، بهترین مدل سرطان ها برای ارزیابی داروها در مرحله پیش بالینی آن ها محسوب می گردند. در این موش ها به دلیل نقص مادرزادی در تکامل بخش قشری تیموس، سیستم ایمنی سلولی توسعه نیافته و در نتیجه بدون تداخلات ایمونولوژیکی، سلول های سرطانی انسان در آن ها رشد می کند. مدل های زئوگرافت تومور ویلمز سبب افزایش دانش بشری در زمینه بیولوژی تومور ویلمز شده و این امکان را برای پژوهشگران فراهم ساخته که بتوانند علاوه بر شناسائی مسیرهای مولکولی این تومور، امکان ارزیابی های جدید پیش بالینی نیز برایشان فراهم گردد (۲۲-۱۹). متأسفانه به دلایل متعدد، رده سلولی استاندارد تومور ویلمز در دسترس نیست. زیرا این سلول های بدخیم پس از چندین پاساژ سلولی، دگرگون (Transformation) شده و از نظر بیولوژیکی با منشاء خود متفاوت می شوند (۲۳).

(۴). با توسعه پاتولوژی مولکولی، اغلب ژن های درگیر در این تومور شناسائی شده و مسیرهای اختلالات مولکولی آن تا حدودی مشخص گردیده است. مهم ترین ژن جهش یافته در بیش از یک سوم از بیماران، WT-1 می باشد. این ژن جزء ژن های عوامل نسخه برداری (Transcriptional factors) محسوب شده و عملکرد آن سبب تکامل دستگاه اداری - تناسلی می گردد. جایگاه این ژن بر روی کروموزوم 11p23 قرار داشته و در برخی از موارد، اختلالات آن با سندرم های دیگری مانند WAGR Syndrome همراه است (۵-۶). در تومور ویلمز، علاوه بر ژن WT-1، اختلال در ژن های دیگر مانند WT-2، IGF-2، CTNNB1 (کد کننده بتاکاتنین) نیز به کرات مشاهده می گردد (۷-۸). از نظر مورفولوژیکی، این تومور در اغلب موارد تک کانونی بوده و چند کانونی بودن بندرت دیده می شود. اگرچه تهاجم و گسترش سلول های توموری به داخل عروق خونی و لنفی در داخل کلیه، آن را شبیه چند کانونی می نماید (۹-۱۰). از نظر هیستوپاتولوژیکی، نمای بافتی کلاسیک سه گانه (Triphasic) آن شامل سلول های بلاستمایی، استرومایی و اپیتلیالی می باشد. هم چنین این سرطان به دو گروه با نمای بافتی مطلوب (Favorable) و نمای بافتی نامطلوب (Unfavorable) تقسیم بندی گردیده است (۱۱). ارزش ارزیابی با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی (IHC) در نوروبلاستوما محدود است، زیرا بروز بسیاری از پروتئین ها و اجزاء آن در نوروبلاستوما، مشابه کلیه بالغ می باشد (۱۲-۱۳). ارزش تشخیصی با میکروسکوپ الکترونی (EM) تنها در مواردی می تواند مطرح باشد که میزان دسترسی به بافت بسیار اندک است (۱۴-۱۵). با وجود این که اطلاعات بالینی همراه با نتایج هیستوپاتولوژیکی با ضریب اطمینان نسبتا بالایی نوروبلاستوما را تأیید می نمایند، اما در پاره ای از موارد تفریق بین نوروبلاستوما از نوروبلاستوما، آسان نبوده و نیازمند آسیب شناسان مجربی می باشد (۱۶).

در ایران به دلیل ثبت نشدن دقیق سرطان ها، اطلاعات متقنی از میزان شیوع آن در دسترس

و  $50 \mu\text{g/ml}$  استرپتومايسين سولفات (Sigma) (Aldrich, USA) به فلاسک‌ها افزوده گردید. در ادامه، فلاسک‌ها در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی  $95\%$  و اتمسفر حاوی  $5\%$  درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه گردیدند. تا روز پنجم به شکل روزانه  $1$  میلی‌لیتر محیط کشت کامل به فلاسک‌ها اضافه شد. فلاسک‌های کشت سلول هر روز از منظر مهاجرت سلول‌ها از اکسپلنت‌ها و تکثیر آن‌ها با میکروسکوپ اینورت مورد مطالعه قرار گرفتند.

**ج) خالص سازی اولیه سلول‌های توموری:**  
زمانی که سلول‌های خارج شده از اکسپلنت‌ها  $50\%$  درصد مساحت کف فلاسک‌ها را فرا گرفتند، تریپسینیزه گردیده و پس از پاساژ دادن، به محیط کشت موجود در فلاسک‌ها تخلیه گردید. سپس سلول‌ها با PBS (Invitrogen, USA) شستشو داده شدند و به مدت  $3$  دقیقه در معرض تریپسین ( $0.25\%$  درصد و EDTA  $1$  میلی‌مولار، Invitrogen, USA) در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از جدا شدن سلول‌ها از ته فلاسک، تریپسین با محیط کشت حاوی  $10\%$  درصد FBS خنثی گردید. سوسپانسیون سلولی به دست آمده به مدت  $7$  دقیقه با نیروی نسبی گریز از مرکز  $g$   $200$  سانتریفیوژ گردید و بعد از تعلیق مجدد، سلول‌ها با نسبت تحت کشت  $1$  به  $3$  به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. قبل از تلقیح سلول‌ها به موش‌های بی‌موی فاقد سیستم ایمنی، خالص سازی نسبی سلول‌ها با  $3$  پاساژ متوالی انجام شد. در جریان هر پاساژ، سلول‌ها از نظر مورفولوژی با میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**د) بررسی تومورزایی در موش‌های بی‌موی فاقد تیموس:** به ازای هر تومور بیمار، ده سر موش بی‌موی فاقد تیموس با جنسیت نر و بازه سنی  $6$  تا  $8$  هفته انتخاب شدند. این موش‌ها در قفس‌های فیلتردار با تهویه مجزا در آزمایشگاه کاشت تومورهای تجربی بیمارستان امام خمینی نگهداری گردیدند. آب و غذای اتوکلاو شده به شکل *ad libitum* در اختیار حیوانات قرار داده می‌شد. با استفاده از پروتکل بیهوشی متعادل القا شده با کتامین  $10\%$  درصد با دوز  $100 \text{mg/kg}$  و

در این مطالعه بر آن شدیم تا برای نخستین بار در ایران، مدل زئوگرافت تومور ویلمز، مشتق شده از بافت بیماران را ایجاد و زمینه را برای پژوهش‌های فارماکولوژیکی، ژنتیکی و هم‌چنین ارزیابی فاز پیش‌بالینی داروهای سرطانی، مهیاء کنیم.

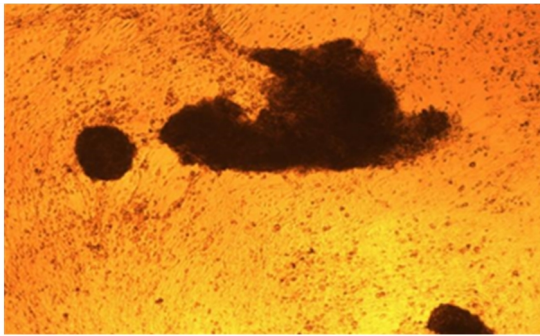
## روش کار

این مطالعه از نوع مطالعات تجربی (Experimental Study) محسوب می‌گردد. کلیه مراحل این مطالعه در مجتمع بیمارستانی امام خمینی تهران و در بازه زمانی زمستان  $1389$  تا بهار  $1391$  انجام گرفت.

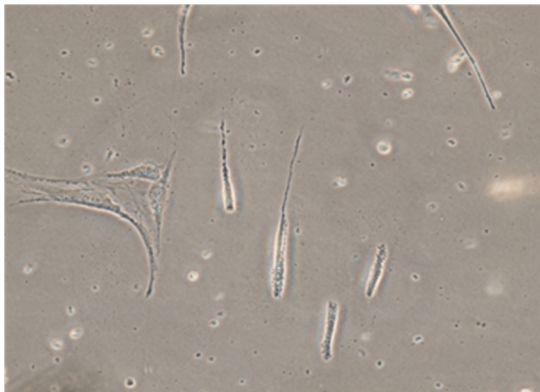
مراحل این مطالعه به شرح زیر می‌باشد:

**الف) اخذ نمونه توموری:** نمونه‌های سرطانی از بافت اولیه  $4$  بیمار مبتلا به تومور ویلمز در مرکز طبی اطفال دانشگاه علوم پزشکی تهران و پس از دریافت فرم رضایت نامه اخلاقی آگاهانه از والدین بیماران اخذ گردید. معیار ورود بیمار به مطالعه، اطمینان از اولیه بودن تومور و عدم سابقه شیمی درمانی و پرتودرمانی بود و برای جلوگیری از تداخل در گزارش آسیب‌شناسی بیمار، یک پاتولوژیست در اتاق عمل حضور داشت. قسمتی از نمونه بافت تازه توموری را در محیط کشت DMEM سرد حاوی  $20\%$  درصد FBS،  $50 \text{ U/ml}$  پنی‌سیلین و  $50 \mu\text{g/ml}$  استرپتومايسين سولفات، به آزمایشگاه سرطان‌های تجربی مرکز تحقیقات سرطان انستیتو کانسر ایران ارسال شد.

**ب) کشت اولیه سلول‌های تومور ویلمز:** قطعات تومور وزن گردیدند و در محلول DBSS (Sigma-Aldrich, USA) شستشو داده شدند. پس از جداسازی قطعات نکروتیک و عروق خونی، تومورها در داخل محلول DBSS با تیغ اسکالپل به اکسپلنت‌های (Explants)  $1$  میلی‌متری تقسیم گردیدند. سپس، اکسپلنت‌های خردشده،  $3$  مرتبه با DBSS شستشو داده شدند. به ازای هر فلاسک کشت سلولی  $25$  سانتی‌متر مربعی،  $20$  الی  $30$  اکسپلنت انتقال داده شد و  $1$  میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 (Invitrogen, USA) حاوی  $40\%$  درصد FBS (Sigma-Aldrich, USA)،  $50 \text{ U/ml}$  پنی‌سیلین (Sigma-Aldrich, USA)



شکل ۱- جداسازی سلول‌های موجود در بافت تومور با تکنیک اکسپلنت اولیه. پیکان‌ها نشان‌دهنده اکسپلنت‌های توموری می‌باشند. (درشت‌نمایی ۴۰×)



شکل ۲- سلول‌های خالص‌سازی شده تومور ویلمز بعد از سه بار پاساژ



شکل ۳- مدل زئوگرافت تومور ویلمز در موش بی‌موی فاقد تیموس

of the Kidney بود که از مطالعه کنار گذاشته شد. جداسازی سلول‌ها از تومور اخذ شده از بیماران با تکنیک Primary Explant با موفقیت اجرا شده (شکل ۱) و سلول‌ها با پاساژهای متوالی خالص‌سازی گردیدند. (شکل ۲). سلول‌های اخذ شده از یکی از بیماران بالاترین درصد تومورزایی (Take rate) را داشته، به طوریکه به حدود ۷۰٪ رسید (شکل ۳). منحنی کینتیک رشد تومورهای زئوگرافت مذکور در شکل ۴ ترسیم گردیده‌اند.

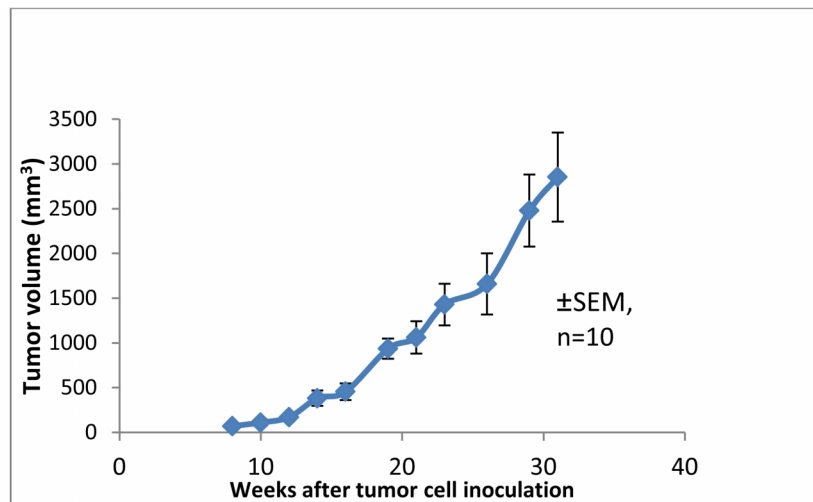
زایلایزین ۲ درصد با دوزاژ ۱۰ mg/kg موش‌ها بیهوش شدند. سپس سوسپانسیون سلولی با دانسیته ۱۰۶ × ۵ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 (Invitrogen, USA) و ۱۰۰ میکرولیتر Matrix Extracellular (Invitrogen, USA) به فلانک موش‌ها تلقیح شد. هر دو روز یک بار، موش‌های مذکور پایش گردیدند و حجم تومورهای ایجاد شده با استفاده از کالیپر دیجیتالی اندازه‌گیری شد. هنگامی که حجم تومور به ۱۵۰۰ میلی‌متر مکعب رسید، موش‌ها اوتانازی شدند و تومور حاصله در فرمالین - بافر ۱۰ درصد تثبیت گردید. در تمام مراحل، اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

**ه) ارزیابی هیستوپاتولوژیکی و ایمونوهیستوشیمی تومورها:** سپس تومورها برای تعیین ماهیت و تأیید حفظ خصوصیات موجود در بدن بیمار اولیه، با رنگ آمیزی H&E و نشانگرهای ایمونوهیستوشیمی CK، Desmin، Myogenin و WT-1، Vimentin (ساخت شرکت Dako دانمارک) مورد مطالعه قرار گرفتند. در آزمایشگاه پاتولوژی، ابتدا پروسس بافتی بر روی آن‌ها انجام گرفته و بلوک‌های پارافینی تهیه گردید. از هر بلوک برش‌هایی به ضخامت ۴ میکرون تهیه گردیده و به روش رنگ آمیزی IHC با آنتی‌بادی‌های ذکر شده مجاورت گردیدند. اسلایدهای H&E و IHC در زیر میکروسکوپ مطالعه گردیدند. در اسلایدهای H&E نمای بلاستی، اپیتلیالی و استرومالی مورد توجه قرار گرفت. در اسلایدهای IHC، میزان رنگ‌پذیری (Immunoreactivity) با توجه به نوع نشانگر، مورد توجه قرار گرفت.

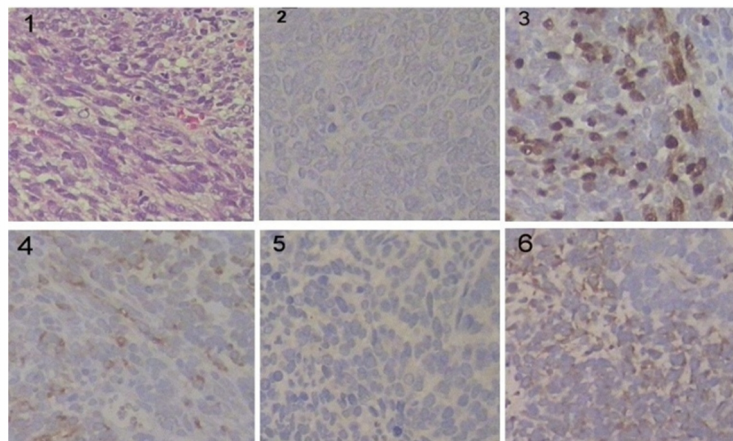
در تمام مراحل مطالعه، به نتیجه پاتولوژیکی بیمار نیز توجه گردید تا چنان‌چه گزارش آسیب‌شناسی بیمار، نفروبلاستوما نباشد، آن نمونه از مطالعه حذف گردد.

### یافته‌ها

بر پایه گزارش آسیب‌شناسی بیماران، یکی از چهار تومور اخذ شده از نوع Clear Cell Sarcoma



شکل ۴- منحنی کینتیک رشد تومور زئوگرافت سلول‌های جدا شده از بیمار



شکل ۵- عکس‌های میکروسکوپی از مدل زئوگرافت ویلمز؛ اسلاید ۱ که نمایی با رنگ آمیزی H&E را نشان می‌دهد. اسلاید شماره ۲ رنگ آمیزی IHC با نشانگر WT-1 را نشان می‌دهد و منفی است. اسلاید ۳ که رنگ آمیزی IHC با نشانگر Myogenin نشان داده و مثبت قوی می‌باشد. اسلاید ۴ رنگ آمیزی شده با نشانگر Desmin را نشان داده و حاکی از مثبت بودن می‌باشد. اسلاید ۵ رنگ آمیزی IHC با نشانگر CK را نشان داده و منفی است. اسلاید شماره ۶ رنگ آمیزی IHC با مارکر Vimentin را نشان داده و مثبت می‌باشد. در مجموع می‌توان از نتایج ایمونوهیستوشیمی چنین برداشت نمود که تومور اولیه بیمار از زیر گروه مولکولی با غالبیت استرومال بوده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

امروزه پژوهشگران به اهمیت مدل زئوگرافت بافت توموری مشتق شده از بیمار (Patient-derived tumor tissue – PDTT) برای توسعه و پیشبرد درمان سرطان‌ها تأکید می‌ورزند. موش‌های بی‌موی فاقد تیموس بصورت مادرزادی یک موتاسیون در ژن FOX-1 داشته و در نتیجه بخش قشری تیموس تشکیل نگردیده و لنفوسیت‌های نوع T در آن‌ها به بلوغ عملی نمی‌رسند. این موش‌ها به همراه موش‌های نقص ایمنی مرکب شدید (Sever combined immunodeficiency – SCID)، در تحقیقات پایه‌ای و پیش‌بالینی

مطالعات میکروسکوپیکی (شکل ۵) نشان داد که تومور زئوگرافت از نظر رنگ آمیزی H&E، خصوصیات هیستومورفولوژیکی اولیه خود را حفظ کرده است. بطوریکه هر سه بخش اپیتلیالی، استرومایی و بلاستمایی را نشان می‌دادند. نتایج IHC نیز با آنتی‌بادی‌های CK، Desmin، Myogenin و WT-1 گویای آن بود که میزان بروز هر نشانگر از مثبت قوی تا مثبت ضعیف متفاوت بوده و در برخی موارد نیز منفی بود. نشانگر WT-1 در حدود ۶۰٪ از تومورهای زئوگرافت، از مثبت ضعیف تا مثبت قوی گزارش گردید.

کردند (۲۰). Pinthus و همکاران نیز با مطالعه بر روی مدل زئوگرافت تومور ویلمز، نشان دادند که گیرنده رشد اپی-تلیالی-۲ (HER-2) متحمل موتاسیون شده و بر اهمیت مهار این گیرنده برای درمان این بیماران تأکید نمودند (۲۱).

اگر چه Li و همکاران در سال ۲۰۰۹، اعلام کردند اولین مدل زئوگرافت ارتوتاپیک با استفاده از رده سلولی WiT49 ایجاد نمودند (۲۲). اما با وجود تلاش‌های متعدد در این موضوع، در حال حاضر رده سلولی استاندارد نفروبلاستوما ایجاد نشده است. زیرا این رده‌های سلولی ناپایدار بوده و اخیراً Giner و همکاران؛ نشان دادند که پس از پاساژ چهارم تومورها، سلول‌های توموری متحمل تغییر از نوع Epithelial mesenchymal transition (EMT) شده و میزان سلول‌های شبه دوکی (Spindle-Like) افزایش می‌یابد (۲۳). با این وجود در حال حاضر و در اغلب آزمون‌های فارماکولوژیکی برای تومور ویلمز، از مدل زئوگرافت PDTT استفاده می‌گردد.

نتایج این مطالعه حکایت از همسو بودن تومورهای زئوگرافتی ایجاد شده با نوع بافتی بیمار دارد. در بررسی اسلایدهای H&E، وجود دو و یا سه فاز از بخش سه گانه اپی تلیالی، استرومائی و بلاستمائی مشاهده گردید. در این مطالعه از چندین آنتی بادی IHC برای کمک به تأیید تومور ویلمز استفاده گردید. واسعی و همکاران از ایران؛ نشان دادند که هنوز نشانگر ایمونوهیستوشیمی قاطعی برای تأیید تومور ویلمز معرفی نشده است (۱۲). با این حال نشانگرهایی وجود دارند که علاوه بر اینکه در تمایز موارد مشکوک تومور ویلمز، کمک کننده هستند، در شناخت مسیرهای مولکولی و ژن‌های درگیر در این فرایند کمک کننده می‌باشند (۲۳). ژن WT-1 علاوه بر نفروبلاستوما، در برخی از لوکمی‌ها نیز متحمل جهش می‌گردد (۲۸). با وجود غیر اختصاصی بودن آن، میزان ایمونوراکتیویته در ۶۰٪ از مدل زئوگرافت مثبت گزارش گردید. CK یک نشانگر اپی تلیالی بوده و در برخی از تومورهای ویلمز بروز می‌نماید. در چند سال اخیر برای تومور ویلمز دو دسته زیر گروه مولکولی تبیین شده است. در

سرطان‌ها بکار می‌روند.

اپیدمیولوژی نفروبلاستوما در ایران چندان مطالعه نگردیده است، اما سید احدی و همکاران؛ در یک مطالعه گذشته نگر ۱۰ ساله، نشان داد که سن متوسط کودکان در زمان تشخیص، ۴۵/۵ ماهگی بوده و بالای ۵۴٪ از آن‌ها دارای نمای بافتی مطلوب می‌باشند. هم‌چنین پس از طی ۴ سال اولیه بعد از درمان، در بالای ۷۰٪ عود مجدد مشاهده نگردید (۱۷). فرانوش و همکاران؛ پرونده ۱۷۵ بیمار دارای تومور ویلمز را بین سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۹۰ میلادی مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها میزان بقاء ۵ ساله را در حدود ۷۶٪ ذکر نمودند (۲۴). Yoa و همکاران؛ چنین مطالعه‌ای را در شرق چین انجام داده و نتایجی مشابه با ایران بدست آورده و ذکر کردند که میزان بقاء بیماران پائین‌تر از کشورهای توسعه یافته می‌باشد (۲۵). هر چند که پائین بودن میزان بقاء در کشورهای در حال توسعه نسبت به کشورهای توسعه یافته دور از منطبق نبوده و عواملی مانند تشخیص دیررس و نگرفتن درمان‌های استاندارد در این پروسه دخیل می‌باشند، اما عوامل ژنتیکی و جغرافیایی نیز می‌توانند در میزان اثربخشی درمان، تأثیرگذار بوده باشند (۲۶). در رخداد تومور ویلمز، عوامل ژنتیکی و اختلال در مسیرهای بیولوژیکی، نقش بارزی دارند (۸-۵). بدون شک شناخت هرچه بهتر این مسیرهای مولکولی، پژوهشگران را برای کنترل هرچه بهتر تومور ویلمز یاری خواهند نمود. از ۵ دهه قبل که ایجاد رده‌های مختلف سلولی سرطان‌های مورد توجه محققان قرار گرفته است، مدل زئوگرافت تومور ویلمز نیز در کنار سایر مدل‌های سرطانی، در حال توسعه بوده و در حال حاضر بسیاری از آزمون‌های پیش‌بالینی و هم‌چنین مطالعات پایه‌ای تومور ویلمز بر روی این مدل‌ها انجام شده است. Abramson و همکاران در سال ۲۰۰۳، به اثر درمانی Pigment epithelium-derived factor (PEDF) را در مدل ارتوتاپیک تومور ویلمز تأکید کردند (۱۹). Bielen و همکاران نیز بر اهمیت اثر مهار گیرنده رشد شبه انسولینی (IGFR-1) در مدل ارتوتاپیک زئوگرافت تومور ویلمز، تأکید

آغاز درمان های ادجونت، بسیار زودتر از کنتیک رشد مدل زنوگرافتی PDTT است. اگرچه ارزیابی حساسیت و یا مقاومت سلول های توموری نسبت به داروهای شیمی درمانی در محیط *in vitro* نیز مطرح است، اما قطعاً ارزش نتایج *in vivo* بالاتر خواهد بود. پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی برای کاهش این محدودیت، از داربست بافتی و یا فاکتورهای رشد بهره گرفته و هر گونه تغییر در مسیرهای مولکولی ناشی از آن بدقت زیر نظر قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه ایمنووهستوشیمی انستیتو کانسر ایران به خصوص سرکار خانم ساقی وزیری کمال تشکر خود را اعلام نموده و این مطالعه با حمایت های دانشگاه علوم پزشکی تهران به اتمام رسید.

### منابع

1. Md Zin R, Murch A, Charles A. Pathology, genetics and cytogenetics of Wilms' tumour. *Pathology*; 2011.43(4):302-3012.
2. Varna A. Wilms' tumor in children: an overview. *Nephron Clin Pract*; 2008.108(2):c83-90.
3. Israels T. Wilms tumor in Africa: challenges to cure. *Pediatr Blood Cancer*; 2012 Jan.58(1):3
4. Tucci S Jr, Cologna AJ, Suaid HJ, Valera ET, Tirapelli LF, Paschoalin EL, Martins AC. Results of novel strategies for treatment of Wilms' tumor. *Int Braz J Urol*; 2007.33(2):195-201.
5. Buckley KS. Pediatric genitourinary tumors. *Curr Opin Oncol*; 2012 May;24(3):291-6.
6. Wang H, Shen Y, Sun N, Jiang YP, Li ML, Sun L. Identification and analysis of mutations in WT1 and WT2 genes in peripheral blood and tumor tissue of children with Wilms' tumor. *Chin Med J(Eng)*; 2012.125(10):1733-9.
7. Clark PE, Polosukhina D, Love H, Correa H, Coffin C, Perlman EJ, de Caestecker M, et al.  $\beta$ -Catenin and K-RAS synergize to form primitive renal epithelial tumors with features of epithelial Wilms' tumors. *Am J Pathol*; 2011.179(6):3045-55.
8. Royer-Pokora B. Genetics of pediatric renal tumors. *Pediatr Nephrol*; 2012. Mar 30. [Epub ahead of print].
9. Hennigar RA, O'Shea PA, Grattan-Smith JD. Clinicopathologic features of nephrogenic rests and

دسته اول سلول های استرومالی غالب بوده و در زیر گروه دوم، با بخش بلاستمال غالبیت دارد (۲۹ و ۲۷). در زیر گروه بلاستمال، CK بصورت قوی بیان می گردد که نشانگر تمایز در مسیر اپی تلیالی می باشد (۳۰ و ۲۷). Desmin یک نشانگر پروتئینی از نوع فیلامان های بینابینی تیپ III بوده و توسط ژن DSE کدگذاری می شود. ظهور آن در تومور ویلمز، مؤید ساختار عضلانی در بافت می باشد. از طرفی، Myogenin نیز یک نشانگر عضلات اسکلتی می باشد. در نفروبلاستوما بروز این دو نشانگر، حکایت از وجود ساختاری عضلانی در داخل سلول های توموری بوده و اغلب در نوع زیر گروه استرومالی مشاهده می گردد (۲۳). Vimtin نیز یک نشانگر فیلامان های بینابینی تیپ III بوده که در بافت هایی با منشأ مزانشیمی ظاهر می شود. این نشانگر در بخش استرومایی و بلاستمایی بکرات دیده می شود (۳۱ و ۲۷) (شکل ۵).

این مطالعه نشان داد که میزان اعتباربخشی (Validity) مدل زنوگرافتی PDTT بالا بوده و تقریباً خصوصیات تومور اولیه را بخوبی حفظ نموده است. ایجاد این مدل از سرطان، پژوهشگران را قادر می سازد که علاوه بر مطالعات انکولوژی پایه ای، مرحله پیش بالینی داروهای جدید ضد سرطان را به پیش ببرند. از سوی دیگر در چندین سال اخیر با روشن تر شدن ابهامات در زمینه فارماکوژنومیکس، امید می رود که محققان بتوانند دستورات عمل هایی جهت ارزیابی درمان های انفرادی با این مدل ها، در دستور کار خود قرار بدهند. در صورت به ثمر رسیدن نتایج این فرضیه، می توان پیش بینی کرد که میزان عوارض دیررس شیمی درمانی در شفا یافتگان از نفروبلاستوما کاهش و میزان بقاء، افزایش یابد.

مهم ترین محدودیتی که مدل زنوگرافتی PDTT تومور ویلمز با آن روبرو بوده و می تواند در ارزیابی آزمون درمان های انفرادی، چالش زا باشد، سرعت پائین رشد تومورها است. چنانچه که در شکل شماره ۴ مشاهده می گردد، کینتیک رشد تومور آهسته بوده و بالغ بر ۶ ماه می باشد. بر طبق پروتکل های استاندارد درمان تومور ویلمز،

G, Mor O, Ramon J, Mor Y. ErbB2 is a tumor associated antigen and a suitable therapeutic target in Wilms tumor. *J Urol*; 2004,172(4 Pt 2):1644-8.

23. Giner F, Machado I, Noguera R, Villamon E, Pellin A, Calabuig-Farinas S, Peydro-Olaya A. et al. The epithelial mesenchymal transition process in wilms tumor: a study based on a xenograft model. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 2011.19(4):369-75.

24. Faranoush M, Bahoush G.R, Mehrvar A, Hejazi S, Vossough P, Hedayatiasa A, et al. Wilm's Tumor: Epidemiology and Survival. *Res. J. Biol. Sci*; 2009. 4 (1): 86-89.

25. Yao W, Li K, Xiao X, Gao J, Dong K, Xiao X, Lv Z. Outcomes of Wilms' tumor in eastern China: 10 years of experience at a single center. *J Invest Surg*; 2012 Jun.25(3):181-5.

26. Savonarola A, Palmirotta R, Guadagni F, Silvestris F. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: role of mutational analysis in anti-cancer targeted therapy. *Pharmacogenomics J*; 2012 Aug.12(4):277-86.

27. Schumacher V, Schuhen S, Sonner S, Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. *Clin Cancer Res*; 2003.9(6):2005-2014.

28. Reinhardt D, von Neuhoff C, Sander A, Creutzig U. [Genetic Prognostic Factors in Childhood Acute Myeloid Leukemia.]. *Kin Padiatr*; 2012.20. [Epub ahead of print]

29. Royer-Pokora B, Busch M, Beier M, Duhme C, de Torres C, Mora J, et al. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet*; 2010 1.19(9):1651-68.

30. Kinoshita Y, Takasu K, Yuri T, Yoshizawa K, Uehara N, Kimura A, et al. Two cases of malignant peritoneal mesothelioma without asbestos exposure: cytologic and immunohistochemical features. *Ann Diagn Pathol*; 2012 Jul 9. [Epub ahead of print].

31. Brown KW, Charles A, Dallosso A, White G, Charlet J, Standen GR, Malik K. Characterization of 17.94, a novel anaplastic Wilms' tumor cell line. *Cancer Genet*; 2012.205(6):319-26.

nephroblastomatosis. *Adv Ant Pathol* 2001;8(5):276-89.

10. Cushing B, Slovis TL. Imaging of Wilms' tumor: what is important! *Urol Radiol*; 1992.14(4):241-51.

11. Hamilton TE, Shamberger RC. Wilms tumor: recent advances in clinical care and biology. *Semin Pediatr Surg*; 2012.21(1):15-20.

12. Vasei M, Moch H, Mousavi A, Kajbafzadeh AM, Sauter G. Immunohistochemical profiling of Wilms tumor: a tissue microarray study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 2008.16(2):128-34.

13. Goregaonkar R, Shet T, Ramadwar M, Chinoy R. Critical role of fine needle aspiration cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of pediatric renal tumors. *Acta Cytol*; 2007.51(5):721-9.

14. Gregory MA, Hadley GP. The evolution of biofilms in venous access devices implanted in children with Wilms' tumour. *Pediatr Surg Int* 1998;13(5-6):400-5.

15. Brahmi U, Srinivasan R, Komal HS, Joshi K, Gupta SK, Rajwanshi A. Comparative analysis of electron microscopy and immunocytochemistry in the cytologic diagnosis of malignant small round cell tumors. *Acta Cytol*; 2003.47(3):443-9.

16. Sharmal S, Mishra K. Limitations in the diagnosis of childhood teratoid lesions on fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol*; 2010. 54(2):142-7.

17. Seyed-Ahadi MM, Khaleghnejad-Tabari A, Mirshemirani A, Sadeghian N, Amonollahi O. Wilms' tumor: a 10 year retrospective study. *Arch Iran Med*; 2007 Jan.10(1):65-9.

18. Sasso G, Greco N, Murino P, Sasso FS. Late toxicity in Wilms tumor patients treated with radiotherapy at 15 years of median follow-up. *J Pediatr Hematol Oncol*; 2010.32(7): 264-7.

19. Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE. Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg*; 2003. 38(3):336-42.

20. Bielen A, Box G, Perryman L, Bjerke L, Popov S, Jamin Y, Jury A, Valenti M, Brandon Ade H, Martins V, Romanet V, Jeay S, Raynaud FI, Hofmann F, Robinson SP, Eccles SA, Jones C. Dependence of Wilms tumor cells on signaling through insulin-like growth factor 1 in an orthotopic xenograft model targetable by specific receptor inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 2012 15.109(20):E1267-76

21. Li MH, Yamase H, Ferrer F. Characterization of a WiT49 cell line derived orthotopic model of Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer*; 2010. 54(2):316-8.

22. Pinthus JH, Fridman E, Dekel B, Goldberg I, Kaufman-Francis K, Eshhar Z, Harmelin A, Rechavi



## Establishment of autochthonous xenograft model of Wilms' tumor in Iran and its application in development of preclinical studies

**Ahad Muhammadnejad**, Postdoc-Fellowship, Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mohamadnajad@yahoo.com

**Abdol-Mohammad Kajbafzadeh**, MD. Pediatric Urology Research Center, Children's Center of Excellence, Department of Pediatric Urology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. kajbafzd@sinatums.ac.ir

**Mohammad-Javad Mohseni**, MD. Pediatric Urology Research Center, Children's Center of Excellence, Department of Pediatric Urology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mjmhohseni@hotmail.com

**Samad Muhammadnejad**, PhD. Research Center for molecular and cellular Imaging, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. smuhammadnejad@gmail.com

**Mohammad-Ali Oghabian**, PhD. Research Center for molecular and cellular Imaging, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. oghabian@sina.tums.ac.ir

**Farrokh Tirgari**, MD. Cancer Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ftirgari@sina.tums.ac.ir

**Mohammad Vasei**, MD. Pediatric Urology Research Center, Children's Center of Excellence, Department of Pediatric Urology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. vasei@tums.ac.ir

**Mahnaz Haddadi**, MSc. Cancer Models Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mahnaz1464@yahoo.com

**Sanaz Rismanchi**, DVM. Cancer Models Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. S.rismanchi88@gmail.com

**\*Saeid Amanpour**, DVM- DVSc. Cancer Models Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\*Corresponding author). saeidamanpour@yahoo.com

### Abstract

**Background:** Wilms' tumor (nephroblastoma) is the most common renal malignancy of childhood. This cancer is considered as an embryonal neoplasm that arises from nephrogenic blastema. Despite advances in therapeutic success, survival rate is still not satisfactory in tumors with unfavorable histology and recurrent cases. On the other hand, late adverse effects of chemotherapy threaten the life of Wilms' tumor survivors. The present study aimed to establish a patient-derived tumor tissue xenograft for utilizing in individualized chemosensitivity assay.

**Methods:** Fresh tumor specimens of 4 patients with Wilms' tumor were obtained by cytoreductive surgery, and after primary culture and initial purification of neoplastic cells, the cells of each tumor were subcutaneously inoculated to 10 athymic nude mice. Growth characteristics of established models were assessed and the tumors were studied by light microscopy.

**Results:** Tumor take rate was reported 70%. Pathological examination illustrated the presence of all epithelial, stromal and blastema parts in H&E staining. Immunohistochemical study with CK, desmin, myogenin, WT-1 and vimentin markers confirmed nephroblastoma.

**Conclusion:** Histopathological study approved the validity of patient-derived tumor tissue xenograft model of Wilms' tumor. Since this model has been established for the first time in Iran, thus it can be considered as a useful research tool for personalized treatment of nephroblastoma and chemoresistance assays.

**Keywords:** Wilms' tumor, Xenograft model, Validity