

## Cell anatomy study of chemotherapy effect on skeletal myofibers diameter

Dr. Abduljawad koubili\*

Dr. Ali Daod\*\*

Bassam Sarem\*\*\*

(Received 12 / 3 / 2023. Accepted 5 / 4 / 2023)

### □ ABSTRACT □

The Study involved tow randomized groups with advanced NonHodgkin's Lymphoma NHL (B-cells) Stage III. The control group included 21 patients before chemotherapy while the cases (oppose) one's included 30 patients after chemotherapy with CHOP-R protocol is finished (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) in 6 cycles 3 weeks apart. Skeletal muscle biopsies performed using needle biopsy. Scanning electron microscope study performed at the Atomic Energy Agency. Results revealed normal values for skeletal muscle fibers in control group while in case group 40% of patients after chemotherapy showed an important decrease in myofibers diameter.

**Keywords:** NonHodgkin's Lymphoma, Chemotherapy, myofibers, Scanning Electron microscope.

**Copyright**



:Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

---

\* Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

\*\* Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

\*\*\* PhD internal scholarship, Department of Cytology and Histology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia. sbassamsarem@gamil.com

## دراسة تشريحية خلوية لأثر العلاج الكيماوي على أقطار الألياف العضلية الهيكلية

د. عبد الجواد قبيلي\*

د. علي داود\*\*

بسام صارم\*\*\*

(تاريخ الإيداع 12 / 3 / 2023. قبل للنشر في 5 / 4 / 2023)

### □ ملخص □

تم اختيار عينة عشوائية من 51 مريض مشخص لديهم لمفوما بائية لاهودجكن NonHodgkin's Lymphoma Stage III وتوزعت عينة الدراسة في مجموعتين شملت مجموعة الشاهد 21 مريض قبل تلقي العلاج الكيماوي وشملت مجموعة الحالات (التعرض) 30 مريض بعد انتهاء المعالجة الكيماوية CHOP-R المتضمنة مشاركة (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) في 6 دورات بفواصل 3 أسابيع. تم أخذ خزع عضلية هيكلية من عضلة الساق التوأمية باستخدام needle biopsy أجريت الدراسة باستخدام المجهر الالكتروني الماسح لدى هيئة الطاقة الذرية. أظهرت النتائج قيماً طبيعية لأقطار الألياف العضلية في مجموعة الشاهد مقابل تراجع واضح في أقطار الألياف العضلية الهيكلية في مجموعة التعرض لدى 40% من المرضى بنهاية العلاج الكيماوي.

الكلمات المفتاحية: لمفوما لاهودجكن - العلاج الكيماوي - الألياف العضلية - المجهر الالكتروني الماسح.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص



CC BY-NC-SA 04

\* أستاذ مساعد، قسم التشريح، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

\*\* أستاذ مساعد، قسم التشريح المرضي، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

\*\*\* طالب دكتوراه، قسم التشريح، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. sbassamsarem@gamil.com

## مقدمة

تشكل العضلات الهيكلية 40% من وزن الجسم<sup>1</sup> وبالتالي فهي توفر بيئة مناسبة لتقييم أثار العلاج الكيماوي ويقدر عدد العضلات بنحو 650 عضلة وتشمل وظائفها المحافظة على الوضعية والحركة وتنظيم حرارة الجسم وتخزين الطاقة ودعم النسيج الرخوة.

يحدث لدى مرضى السرطان cancer patients تراجع<sup>2,3</sup> في القوة strength والكتلة العضلية muscle mass بنسبة 40% عند تشخيص السرطان وتصل النسبة إلى 70% مع تقدم المرض ما ينتج عنه دنف Cachexia وتعب Fatigue عضلي والذي قد يحدث بنتيجة المرض نفسه أو العلاج والأعراض الناتجة عن ذلك بالإضافة للعوامل النفسية خاصة اضطرابات المزاج.

يحدث التعب العضلي<sup>4</sup> عند مرضى السرطان بنسبة 90% بعد العلاج الكيماوي ويشار للتعب على أنه شعور شخصي بالإرهاق tiredness والضعف weakness وفقدان الطاقة lack of energy وفي 70% من الحالات يكون التعب العضلي معتدل moderate إلى severe شديد ويستمر لأشهر وأحياناً سنوات بعد انتهاء العلاج الكيماوي.

يعتبر الدنف ( BMI > 20 kg/m<sup>2</sup> ) من المضاعفات الاستقلابية<sup>5</sup> complicated metabolic syndrome للسرطان الناتجة عن زيادة استهلاك الحريات والبروتين caloric/protein intake ويتميز بفقدان الكتلة العضلية مع أو بدون الكتلة الدهنية والسبب الرئيسي الإفراز المفرط للسيبتوكينات (tumor necrosis factor) والانتروكينينات (interleukin-6) والتي تحدث نقص شهية anorexia وزيادة في الغلوكاغون والكورتيزول والكاتيكولامينات ما يحدث زيادة في الاستقلاب على حساب هدم البروتين والشحوم، وتشمل بقية الوسائط انخفاض هرمون التستوسترون testosterone ونقص عامل النمو insulin-like growth factor-1 وزيادة ال myostatin و glucocorticoids.

تعتبر لمفوما لاهودجكن<sup>6</sup> أشيع السرطانات الدموية وتصيب الذكور أكثر بمرتين من الإناث ويمكن أن تحدث في أي عمر وفي 57% من الحالات يكون العمر عند اكتشاف المرض 60 فما فوق.

العرض الأشيع للإصابة ضخامة العقد اللمفية في العنق أو الإبط أو الفخذ، وتتميز المرحلة Stage III بإصابة العقد اللمفية فوق وتحت الحجاب الحاجز diaphragm أو إصابة العقد فوق الحجاب بالإضافة للطحال spleen.

يستخدم Doxorubicin<sup>7</sup> وهو صاد حيوي من زمرة Anthracyclines بشكل واسع في علاج العديد من السرطانات. وفي لمفوما لاهودجكن تتم مشاركته مع Cyclophosphamide و vincristine ضمن بروتوكول CHOP.

يثبط Doxorubicin أنزيم topoisomerase II ما يمنع حلزون DNA من التسخ replication كما أنه يتأكسد إلى مركب غير ثابت ينتج عن ارجاعه في المتقدرات إنتاج (ROS) mitochondrial reactive oxygen species تخرب الغشاء الخلوي وتعمل سبيل الموت الخلوي المبرمج (الاستماتة) apoptosis. بألية مشابهة تؤكد أنزيمات السيبتوكروم C450 ال cyclophosphamide وينتج عن ارجاعه مركبات<sup>8</sup> mitochondrial reactive oxygen species (ROS) تخرب الغشاء الخلوي والمتقدرات وال DNA وتعمل بروتينات Caspase cascade وهي أنزيمات protease تلعب دور هام في الاستماتة الخلوية. يثبط ال vincristine<sup>9</sup> تشكل النبيبات الدقيقة لمعزل الانقسام ما يؤدي إلى توقف انقسام الخلية في الطور metaphase.

## أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من دراسة التأثير السمي للأدوية المستخدمة في العلاج الكيماوي للسرطان على الألياف العضلية الهيكلية في وقت تشير فيه الدراسات إلى تراجع الكتلة العضلية بعد العلاج الكيماوي بنسبة 40-70% كأحد أشيع الآثار الجانبية لهذا العلاج ويهدف البحث إلى تقييم التراجع الحاصل في أقطار الألياف العضلية الهيكلية لدى مرضى اللفوما بعد انتهاء المعالجة الكيماوية.

## طرائق البحث ومواده:

تم اختيار عينة عشوائية من 51 مريض مشخص لديهم لطفوما NonHodgkin's Lymphoma Stage III مع أعراض عامة (تعرق، حرارة، نقص وزن) وتوزعت عينة الدراسة في مجموعتين: مجموعة الشاهد **Control**: شملت 21 مريض ومريضة قبل تلقي العلاج الكيماوي. مجموعة الحالات (التعرض) **Cases**: شملت 30 مريض ومريضة بعد أسبوع من انتهاء المعالجة الكيماوية CHOP-R المتضمنة مشاركة بين Cyclophosphamide بجرعة  $750 \text{ mg/m}^2$  و Doxorubicin (Hydroxydaunorubicin) بجرعة  $50 \text{ mg/m}^2$  و vincristine (Oncovin) بجرعة  $1.4 \text{ mg/m}^2$  بالإضافة إلى Prednisone بجرعة  $40 \text{ mg/m}^2$ ، و rituximab بجرعة  $10 \text{ mg/mL}$  وذلك في 6 دورات بفواصل 3 أسابيع بين الجرعات.

تم أخذ خزع عضلية هيكلية من عضلة الساق التوأمية<sup>10</sup> gastrocnemius باستخدام needle biopsies تحت التخدير الموضعي وأجريت الدراسة باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح لدى هيئة الطاقة الذرية. اعتمدت منهجية البحث العلمي<sup>11</sup> للدراسة على تصميم الحالة- شاهد وحساب الدالات الإحصائية الخاصة بمعامل الأرجحية لهذا التصميم.

شملت معايير الاستبعاد exclusion criteria وجود أي مما يلي: (ضمور عضلي Atrophy، اعتلال عضلي Myopathy سواء بدئي أو ثانوي أو وراثي، حثل عضلي Dystrophy، التهابات العضلات myositis، أمراض جهازية، أمراض مزمنة).

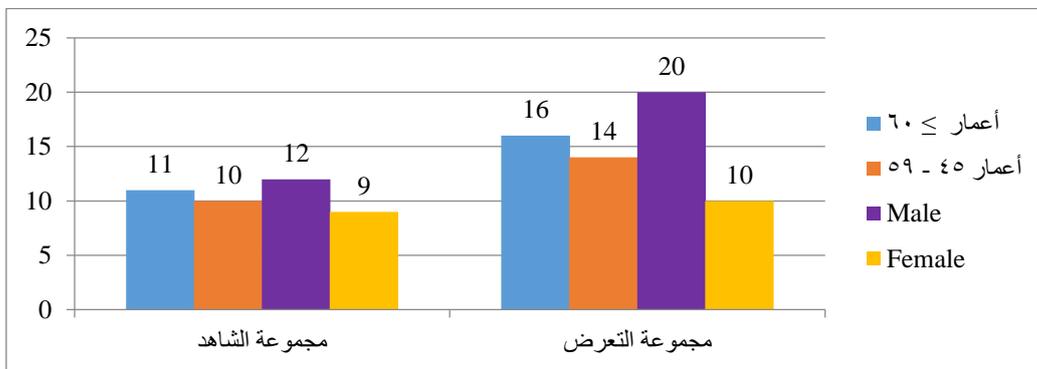
## الدراسة بالمجهر الإلكتروني<sup>12</sup>:

- تقطيع الخزعات بأبعاد  $1 \times 1 \times 3 \text{ mm}$
- التثبيت Fixation باستخدام 2.5% glutaraldehyde لمدة 3 ساعات بدرجة  $37^\circ\text{C}$ .
- التشريب Embedding بالبارافين للحصول على الكاسيت.
- التقطيع Slicing باستخدام ميكروتوم Microtome آلي إلى مقاطع بسماكة 5 ميكرون ثم فرد المقاطع Sections على حوض مائي مضبوط الحرارة على  $55^\circ\text{C}$  ثم أخذها على شرائح مجهرية slides.
- إزالة البارافين باستخدام الكزيلول Xylool الدافئ بدرجة حرارة  $55^\circ\text{C}$  لمدة 5 دقائق.
- إزالة الماء dehydration باستخدام الإيثانول 100% لمدة 5 دقائق ثم الإيثانول 95% لمدة 5 دقائق.
- تجفف العينات ثم تدرس بالمجهر الإلكتروني الماسح.

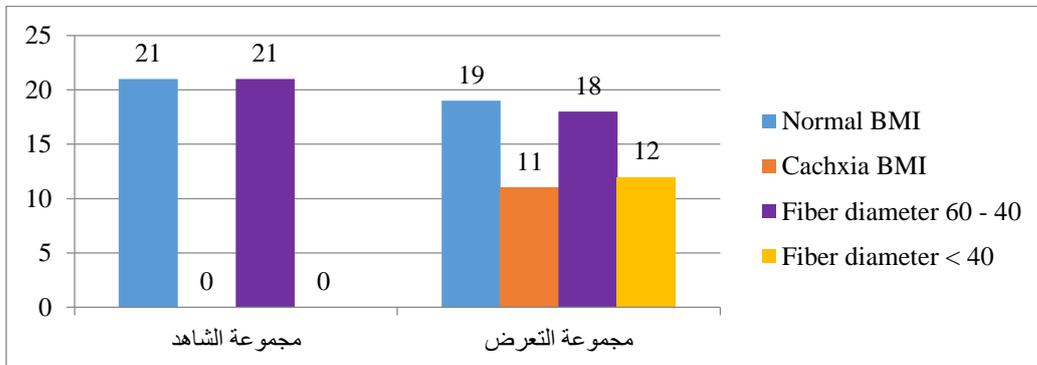
تم استخدام حزمة الكترونية 30KV بسرعة 6 وتراوحت قوة التكبير بين 3.00-6.00 Kx وتم استخدام حزمة مركزة والاضهار على كاشف VEGA//TESCAN. تم قياس أقطار الألياف العضلية باستخدام البرمجيات الملحقة بالمجهر الإلكتروني حيث تم إجراء القياس على عدة ألياف (10 ألياف في كل عينة) للحصول على متوسط وتم ضبط دقة القياس باختيار الألياف بحيث يكون مستوى القطع عمودي على محور الليف العضلي.

### النتائج:

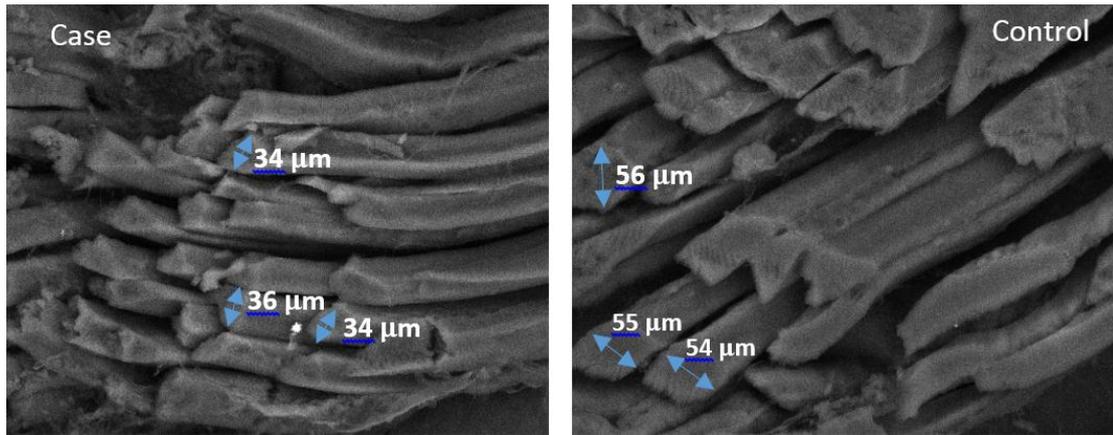
تراوحت الأعمار في مجموعة الشاهد بين 45 - 65 سنة، وفي مجموعة التعرض بين 45 - 66 سنة، وكانت نتائج الدراسة على النحو التالي:



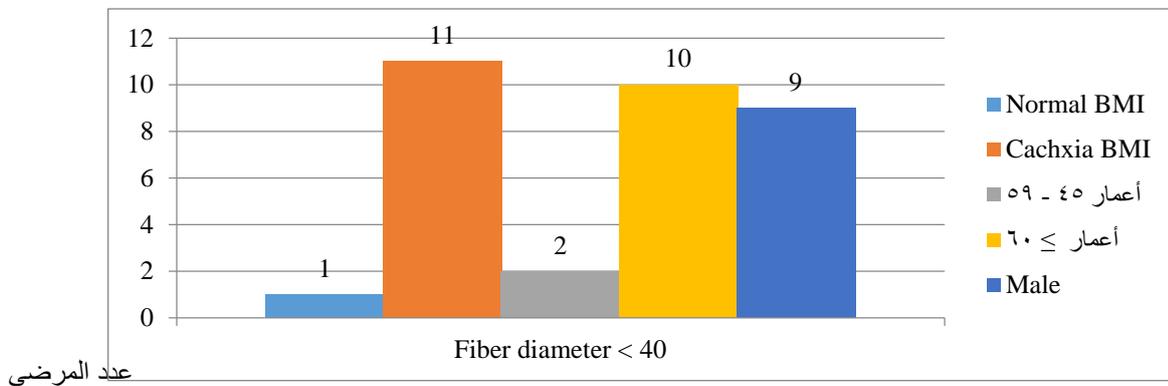
مخطط (1) يوضح توزع العينة تبعاً للعمر والجنس في مجموعتي الشاهد والتعرض



مخطط (2) يوضح توزع العينة تبعاً لمشعر كتلة الجسم BMI وقطر الألياف العضلية Fiber diameter في مجموعتي الشاهد والتعرض



مصور (1) يوضح قياسات أقطار الألياف العضلية لمجموعتي الشاهد والتعرض



مخطط (3) يوضح توزيع العمر والجنس ومشعر كتلة الجسم BMI لدى مرضى مجموعة التعرض الذين سجلوا تراجع في أقطار الألياف العضلية

## المناقشة:

\* يظهر المخطط (1) توزيع العينة تبعاً للعمر والجنس في مجموعتي الشاهد والتعرض. بلغ عدد المرضى في مجموعة الشاهد 21 مريض منها 12 ذكور أي بنسبة 57.14% و 9 إناث بنسبة 42.85%، تراوحت الأعمار في مجموعة الشاهد بين 45-65 سنة وسجلت الأعمار  $\leq 60$  نسبة 52.38% بمعدل 11 مريض مقابل 10 مرضى بأعمار 45-59 أي بنسبة 47.61%.

بلغ عدد المرضى في مجموعة التعرض 30 مريض منها 20 ذكور أي بنسبة 66.66% و 10 إناث بنسبة 33.33% وتراوحت الأعمار بين 45-66 سنة وسجلت الأعمار  $\leq 60$  نسبة 53.33% بمعدل 16 مريض بينما كانت نسبة المرضى بأعمار 45-59 سنة 46.66%.

وبحساب معامل الأرجحية (OR) كانت القيمة أقل من واحد أي أن حدوث الإصابة عند الذكور أكثر من الإناث وتشخيص المرض لدى أكثر من نصف الحالات بأعمار  $\leq 60$  المشاهد في مجموعتي الشاهد والتعرض كان بنتيجة فروق حقيقية وليس بمحض الصدفة.

\* يظهر المخطط (2) توزع العينة تبعاً لمشعر كتلة الجسم BMI وقطر الألياف العضلية Fiber diameter في مجموعتي الشاهد والتعرض.

ويلاحظ أن جميع المرضى في مجموعة الشاهد سجلت لديهم قيم طبيعية لمشعر كتلة الجسم ( $BMI > 20$ ) وكانت أقطار الألياف العضلية لعضلة الساق التوأمية ضمن المجال الطبيعي 40-60 ميكرون (القياسات عند الإناث أقرب للحدود الدنيا للمجال الطبيعي وعند الذكور أقرب للحدود العليا).

بينما في مجموعة التعرض سجلت قيم طبيعية لمشعر كتلة الجسم لدى 19 مريض أي بنسبة 63.33% بينما كانت قيمة BMI ضمن مجال الدنف لدى 11 مريض بنسبة 36.66%، وكانت أقطار الألياف العضلية ضمن المجال الطبيعي لدى 18 مريض بنسبة 60% مقابل 40% (12 مريض) سجل لديهم تراجع واضح في قياسات أقطار الألياف العضلية لعضلة الساق التوأمية.

وبحساب معامل الأرجحية (OR) كانت القيمة أقل من واحد لتدل على أن الدنف وتراجع أقطار الألياف العضلية المشاهد بعد العلاج الكيماوي في مجموعة التعرض كان بنتيجة فروق حقيقية وليس صدفة.

\* يوضح مخطط (3) توزع العمر والجنس ومشعر كتلة الجسم BMI لدى مرضى مجموعة التعرض الذين سجلوا تراجع في أقطار الألياف العضلية والبالغ عددهم 12 مريض حيث كانت قيم BMI واقعة ضمن مجال الدنف لدى 11 مريض أي بنسبة 91.66% وكانت الأعمار  $\leq 60$  بنسبة 83.33% بمعدل 10 مريض وكانت نسبة 75% من المرضى ذكور (9 مريض).

وبحساب معامل الأرجحية (OR) كانت القيمة أقل من واحد ما يدل على ارتباط بين الجنس ( $\sigma$ ) وتراجع أقطار الألياف العضلية المشاهد بعد العلاج الكيماوي في مجموعة التعرض، ويمكن تفسير ذلك بتراجع التستوسترون عند الذكور بنتيجة العلاج الكيماوي.

\* في دراسة مقارنة<sup>13</sup> بعنوان Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma أجريت في جامعة فيلادلفيا University of Philadelphia وتم نشرها في National library of medicine عام 2021 كان 57% من المرضى بأعمار  $< 65$  سنة بينما في دراستنا سجلت الأعمار  $\leq 60$  بنسبة 52.38%، 53.33% على التوالي في مجموعتي الشاهد والتعرض وهي نسب قريبة من الدراسات العالمية، وفي نفس الدراسة كانت نسبة إصابة الذكور ضعف الإناث وفي دراستنا كانت نسبة إصابة الذكور في مجموعتي الشاهد والتعرض 57.14%، 66.66% على التوالي (متوسط 61.9%) وهي نسبة تتوافق مع إصابة الذكور ضعف الإناث ويمكن تفسير الفروقات بالعوامل الاثنية والبيئية وفروقات الاعتيان.

\* في دراسة مقارنة<sup>14</sup> بعنوان Cachexia induced by cancer and chemotherapy أجريت في قسم التشريح والبيولوجيا الخلوية في جامعة Indiana University وتم نشرها في National library of medicine في شباط 2019 سجل تراجع في أقطار الألياف العضلية لدى 47% من المرضى بعد العلاج الكيماوي وفي دراستنا كانت النسبة 40% ويمكن تفسير الفروقات بالعوامل الاثنية والبيئية وفروقات الاعتيان.

\* في دراسة مقارنة<sup>15</sup> بعنوان Cachexia and Lymphoma: Retrospective study of weight loss during treatment by chemotherapy. أجريت في جامعة Strasbourg بين عامي 2012 - 2019 كانت نسبة حدوث الدنف لدى مرضى لمفوما لاهودجكن 39% بينما كانت النسبة في دراستنا 36.66% وهي نسب متقاربة.

## الاستنتاجات والتوصيات:

- التقدم بالعمر (الأعمار  $\leq 60$ ) وكون الجنس (ذكور) عامل خطر يزيد من الآثار السمية للعلاج الكيماوي على الألياف العضلية الهيكلية.
- التراجع الواضح في أقطار الألياف العضلية الهيكلية بعد العلاج الكيماوي يفسر إلى حد كبير شدة واستمرارية التعب والذنف المشاهد بعد العلاج الكيماوي.

## References:

1. Frontera, R.; Julien, Ochala. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 2015 Mar;96(3):183-95 doi: 10.1007/s00223-014-9915-y. Epub 2014 Oct 8.
2. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* 2011;12:489–495.
3. Barreto R, Mandili G, Witzmann FA, Novelli F, Zimmers TA, Bonetto A. Cancer and chemotherapy contribute to muscle loss by activating common signaling pathways. *Front Physiol*. 2016;7:472.
4. Gilliam LA, St Clair DK. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:2543–2563.
5. Damrauer JS, Stadler ME, Acharyya S, Baldwin AS, Couch ME, Guttridge DC. Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- $\kappa$ B and cancer cachexia. *Basic Applied Myology* 2008;18:139–148.
6. Alexander, D.D.; Mink, P.J.; Adami, H.O.; Chang E.T. et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer*. 2007; 120: 1-39
7. reedman AS, Jacobson CA, Mauch P, Aster JC. Chapter 103: Non-Hodgkin's lymphoma. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 10th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
8. National Cancer Institute. Physician Data Query (PDQ). Adult Non-Hodgkin Lymphoma Treatment. 2018. Accessed at <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/hp/adult-nhl-treatment-pdq> on May 3, 2018.
9. Roschewski MJ, Wilson WH. Chapter 106: Non-Hodgkin Lymphoma. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. Abeloff's Clinical Oncology. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2014.
10. Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ, Berquist TH, O'Connor MI. Compartmental anatomy relevant to biopsy planning. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2007;11:16–27
11. Scientific research methodology 3rd Edition. The Arab Center for Arabization, Translation and Authorship. Nov. 2010
12. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Cambridge University Press; New York: 2000
13. Krishna C. Thandra,1, Adam Barsouk, Kalyan Saginala, Sandeep Anand Padala, Alexander Barsouk, and Prashanth Rawla. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*. 2021 Mar; 9(1): 5. doi: 10.3390/medsci9010005

14. Fabrizio Pin, Rafael Barreto, Marion E. Couch, Andrea Bonetto, and Thomas M. O'Connell. Cachexia induced by cancer and chemotherapy yield distinct perturbations to energy metabolism. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019 Feb; 10(1): 140–154. doi: 10.1002/jcsm.12360
15. Joris Mallard, Cédric Baudinet, Ghislain Quai. Cachexia and Lymphoma: Retrospective study of weight loss and inflammation evolution during treatment by chemotherapy. Strasbourg University (ICANS). May 2017