

دراسة ارتيادية في المختبر لتقييم فعالية معالجات كيميائية وتوليفية في القضاء على الخلايا الجذعية السرطانية الثديية المتهمة بنكس الورم

مجد الجمالي*

المُلخَص

خلفية البحث وهدفه: تواترت البحوث خلال العقد الأخير التي أكدت دور الخلايا الجذعية السرطانية في نشوء الأورام ومقاومة العلاجات الكيميائية التقليدية والتسبب بالنكس. وهدفت البحوث الرائدة في هذا المجال إلى تحديد التوليفات الدوائية المثلى للقضاء على هذه الخلايا واستئصال الأورام. مواد البحث وطرائقه: غُزلت خلايا من عينات أورام ثدي أولية، واستُنبتت في الزجاج في شروط التصاقية ولا التصاقية، وقيس التعبير الجيني لعدد من المورثات النوعية لخلايا سرطان الثدي قبل تعريض الخلايا وبعدها تلك الخلايا المستنبتة للأدوية الكيميائية التقليدية وغير التقليدية الموصوفة لعلاج مريضات سرطان الثدي. النتائج: تمتع قسم من الخلايا المعزولة بصفات الخلايا الجذعية السرطانية من حيث بطء زمن التضاعف، وتشكيل الكرات الثديية في شروط لا التصاقية، والتعبير الجيني المرتفع لبعض المورثات النوعية. كما اختلفت استجابة الخلايا للأدوية المطبقة، وكانت تسمم الخلايا أعظماً لدى استخدام الدوكسوروبيسين والإبييتاكسل والسمفاستاتين. الاستنتاج: قَدِّمَ هذا البحث نموذجاً مخبرياً لنخل الأدوية والتوليفات الدوائية التقليدية وغير التقليدية المستهدفة للخلايا السرطانية الجذعية وغير الجذعية لسرطان الثدي بما يمهد الطريق لدعم القرار العلاجي الأنجع في استئصال الورم. كلمات مفتاحية: خلايا جذعية سرطانية ثديية، تعبير جيني، نموذج لنكس الورم، ميتفورمين، سمفاستاتين.

* مدرس - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

An in-Vitro Pilot Study to Evaluate the Efficacy of Chemo- and Combinatorial Treatments to Eradicate Breast Cancer Stem Cells Accused of Tumor Relapse

Majd Aljamali*

Abstract

Background & Objectives: A plethora of research studies during the last decade assured the role of cancer stem cells (CSCs) in tumorogenesis, resistance to traditional chemotherapies, and tumor relapse. New research in this field aims at determining optimal drug combinations to target these cells and eradicate tumors.

Methods: Cells were isolated from primary breast cancer samples, then cultured in-vitro in adherent and non-adherent conditions, followed by measuring expression of several breast cancer specific genes before and after exposing cultured cells to traditional and non-traditional chemotherapies prescribed to breast cancer patients.

Results: Some isolated cells maintained the characteristics of breast cancer stem cells (BCSCs) as for their slow doubling time in culture, mammosphere formation in non-adherent conditions, and increased expression of specific genes. Additionally, cells responded differentially to applied drugs, with the highest cytotoxicity attributed to Doxorubicin, Ebetaxel, and Simvastatin.

Conclusion: This research offers a laboratory model to screen traditional and non-traditional drugs and drug combinations targeting breast cancer stem and non-stem cells, paving the way to support the most effective therapeutic decision successful in tumor eradication.

Keywords: Breast cancer stem cells (BCSCs), gene expression, model for tumor relapse, Metformin, Simvastatin.

* Lecturer in Dept. of Biochemistry & Microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus, University.

المقدمة:

من حيث قدرتها على الانقسام اللا متناظر Asymmetrical وتجدها الذاتي Self-renewal. وتشير جملة من الدلائل إلى أن CSCs هي المسؤولة مباشرة عن إمداد الورم بالخلايا السليفة المتكاثرية المشكّلة لمعظم خلاياه، وقد أظهرت دراسات عدّة استخدم فيها نموذج اغتراس خلايا الورم في الفئران منقوصة المناعة Immuno-Compromised Mice، أنّ عدداً قليلاً لا يتجاوز المئات من الخلايا CSCs يكفي لتوليد الورم، في حين لا تستطيع خلايا الورم الأخرى غير الجذعية توليد الورم حتى ولو حُقِنَ عدد أكبر بعدة مراتب من الخلايا بالمقارنة بذلك المستخدم من CSCs⁷. وكانت أولى الخلايا CSCs التي عُزلت وُثِّمَت هي الخلايا الجذعية الالبيضاضية Leukemic Stem Cells أو (LSCs)⁸، بينما تتابع الدراسات التي عرّفت الخلايا CSCs في الأورام الصلبة، ومن أهمها الخلايا الجذعية لسرطان الثدي Breast Cancer Stem Cells أو (BCSCs)^{9,10}. ونذكر هنا أن نسبة الخلايا CSCs المحددة في الدراسات السابقة راوحت بين 0.001% للخلايا LSCs لتصل في بعض عينات سرطان الثدي إلى ما يقارب 10% من كتلة الورم¹¹. وبقي أن نذكر أن النموذج التراتبي ما زال يتنافس مع نموذج آخر عشوائي Stochastic Model، يفترض أن لدى جميع الخلايا المكونة للورم غير المتجانس كموناً متساوياً لتوليد الورم، ويفسر الكثير من الظواهر المحيطة بالورم، بما في ذلك النكس الذي ربما ينتج بحسب هذا النموذج عن مقاومة بعض الخلايا الورمية واستعادتها لسعتها التكاثرية مرة أخرى بعد انتهاء مدة المعالجات التحريضية والداعمة³. فضلاً عن القدرة على الانقسام غير المتناظر، يبدو أن الخلايا CSCs تشترك مع الخلايا ASCs بخصائص أخرى منها^{6,8}: التحكم بالتجدد الذاتي عن طريق سبل متماثلة للإشارة الخلوية Cell Signalling، والتعبير عن عوامل انتساخ متشابهة مثل OCT-4 و Nanog و Sox2، وفعالية مرتفعة لإنزيم التيلوميراز Telomerase، والتعبير عن

يحتل السرطان المركز الثالث في سورية من حيث التسبب بالوفيات بعد أمراض القلب والتنفس حسب تقارير حديثة صادرة عن وزارة الصحة¹، ويعدّ أحد أكبر التحديات التي تواجه الرعاية الصحية في المجتمع السوري نظراً لطبيعته المزمنة والتكاليف المرتفعة جداً لتدبير المرضى، ولاسيماً مع المشكلات التي يفرضها عدم توافر الأدوية الكيميائية المستوردة لأسباب عدّة. ومع أن العقود الماضية قد شهدت تطوراً كبيراً في البروتوكولات العلاجية من معالجات كيميائية فضلاً عن العلاج الشعاعي. يمثل نكس الورم وعودة نمو الخلايا وانتقالها لتغزو أنسجة وأعضاء أخرى التحدي الأهم أمام كفاءة تلك البروتوكولات، الذي قد ينتهي بإخفاقها وبترافق مع البقاء Survival قصيرة الأمد لمرضى السرطان².

وقد شهدت العقود القليلة الماضية كثافة في البحوث التي هدفت إلى فهم آليات النكس ومحاولة ترجمة هذه المعرفة في التوصل إلى علاجات تحدّ من ذلك. ومن أكثر الدراسات إثارةً تلك المتعلقة بما أُطلق عليه بالخلايا الجذعية السرطانية Cancer Stem Cells أو (CSCs) التي وُصفت بأنها خلايا هامة Quiescent غير متمايزة Undifferentiated توجد في العديد من أنماط السرطان، وتتصف بمعدل نمو بطيء مع امتلاكها لكمونٍ عالٍ لإنتاج خلايا سليفة (طلائعية) Progenitor Cells للخلايا السرطانية تشكّل غالبية خلايا الورم^{3,6}. وتبعاً للدراسات التي تناولت الخلايا CSCs، يُعتقد أنّ الأورام الصلبة وبيضاضات الدم تتألف من ثلاثة أنواع من الخلايا؛ خلايا جذعية سرطانية متجددة ذاتياً، وخلايا سليفة Progenitors ذات سعة تكاثرية عالية، وأخيراً خلايا سليفة تخضع لتمايز محدود³. وأطلق على هذا النموذج بالنموذج التراتبي Hierarchical Model، الذي يفترض أنّ الخلايا CSCs تنشأ من استحالة الخلايا الجذعية البالغة Adult Stem Cells أو (ASCs) وتشبهها

الذي يستقلب بعض الأدوية الكيميائية؛ ممّا يزيد من مقاومة هذه الخلايا لبعض الزمر الدوائية⁹. ولما سبق كلّه، ركّزت بعض الدراسات الحديثة على إيجاد بدائل أو مضافات دوائية للعلاجات الكيميائية العيارية تستهدف الخلايا CSCs. وبرزت في هذا المجال مركّبات دوائية، من بينها الميتفورمين والستاتينات، التي تعمل عبر آليات مختلفة وربما غير مكتشفة بشكل كلي على زيادة تحسيس Sensitization الخلايا CSCs للأدوية الكيميائية، ممّا يقترح إعطاءها كمضافات دوائية على بروتوكولات المعالجة الكيميائية. فقد قُدّمت العديد من الأدلة التي بينت دوراً للميتفورمين مضافاً لعدد من الأورام، من بينها سرطان الثدي، عبر آليات مباشرة تعتمد على تخفيضه لسكر الدم، أو آليات غير مباشرة تعتمد على تداخله في بعض السبل الإشارية داخل الخلية¹⁵. أمّا بالنسبة إلى زمرة الستاتينات، وأهمها السمفاستاتين، فقد تبين أيضاً دورها في تخفيض اختطار الأورام Tumor Risk، ودورها الإيجابي في زيادة تحسيس الأورام للمعالجات الكيميائية والشعاعية^{16,18}. وتتناول هذه الدراسة الارتيادية توصيفاً جزئياً لجمهرة خلايا لها بعض خصائص الخلايا الجذعية السرطانية الثديية Breast Cancer Stem Cells، أو (BCSCs) ومقارنتها بجمهرة خلايا سرطانية غير جذعية Breast Cancer Cells، أو (BCCs) معزولتين من عينات أولية لمريضات سرطان ثدي سوريات لم يخضعن للعلاج الشعاعي أو الكيميائي بعد. كما دُرِس تأثير بعض الأدوية الكيميائية العيارية المستخدمة في بروتوكولات العلاج الكيميائي لمريضات سرطان الثدي على كلتا الجمهرتين الخلويتين فضلاً عن تطبيق بعض الأدوية الموائمة للعلاج الكيميائي بهدف زيادة تحسيس Sensitization الخلايا BCSCs للأدوية الكيميائية. ونعتقد أن هذا العمل سيمهد الطريق لإمكانية عزل الخلايا الجذعية السرطانية الأولية المحضرة من الأنسجة الورمية المأخوذة من مريضات حديثات التشخيص ومن ثمّ تحديد

بروتينات النقل ABC، التي تدعى أيضاً بروتينات المقاومة المتعددة للأدوية Multi-drug Resistance (MDR) Proteins، والتأهب المسبق للاستقلالية عن عوامل النمو من خلال إفراز عوامل نمو وسيتوكينات ذات تأثير هرموني ذاتي Autocrine Effect، وتحريض تولّد الأوعية Angiogenesis، وأخيراً التعبير عن واسمات سطحية متشابهة، مثل CXCR4 و CD133. وبينما تبدي معظم خلايا الورم، التي يمكن وصفها بالخلايا السرطانية غير الجذعية، استجابة متفاوتة لبروتوكولات وتوليفات مختلفة من العلاجات الكيميائية، تُبدي الخلايا الجذعية السرطانية مقاومةً مستمرةً ومعدلات بقيا مرتفعة لاحقاً لتلك المعالجات^{12,13}. فالنمو البطيء لخلايا CSCs، التي عادة ما تقبع بين الطورين G0/G1 من الدورة الخلوية Cell Cycle، يخفض من استجابتها لمعظم العوامل السامة للخلايا التي تستهدف الخلايا المنقسمة في الطورين S أو M. ويكون ذلك على عكس الخلايا السرطانية غير الجذعية ذات السعة التكاثرية العالية، بحيث تُمضي هذه الأخيرة معظم دورتها الخلوية في الطورين S/M وتستجيب للأدوية الكيميائية المستهدفة للخلايا في هذين الطورين. زيادةً على ذلك، فقد أشارت تقارير حديثة إلى أن خلايا CSCs تعبّر عن مستويات مرتفعة من النواقل البروتينية Transporters، وخاصةً بروتينات MDR، التي تقوم بطرد معظم الأدوية إلى خارج الخلايا، الأمر الذي قد يفسّر أيضاً معاندة هذه الخلايا للمعالجات الكيميائية التقليدية على تنوعها من حيث البنية الكيميائية وآليات التأثير^{14,13}. كما تستوطن الخلايا CSCs بيئةً قليلة الأكسجة؛ ممّا يخفض من تشكل الجذور الحرّة القاتلة للخلايا الناتجة عن المعالجات الكيميائية. وتمتلك بعض أنواع الخلايا CSCs الجذعية السرطانية، مثل الخلايا LSCs الجذعية الالبيضاضية و BCSCs، تعبيراً مرتفعاً عن إنزيم ألدهيد ديهيدروجيناز Aldehyde Dehydrogenase (ALDH) أو

عزل الخلايا الجذعية السرطانية واستنباتها من الورم**الأولي Cell Isolation & Culturing**

بعد استئصال الكتلة السرطانية من عينات مريضات سرطان الثدي، وُضِعَتْ في وسط مغذٍ DMEM بحوي 5% مصل جنين بقرياً، فضلاً عن صادرات حيوية (بنسلين + ستريتومايسين) ومضاد فطري. قسّمت العينة إلى قطع بأبعاد 0.5 x 0.2 سم بواسطة مشارط معقمة. حُضِنَت العينات بوجود مزيج من إنزيمين حاليين للأنسجة هما الإنزيم الحال للكولاجين/الكولاجيناز Collagenase والإنزيم الحال للحمض الهيلوروني Hyaluronidase مدة 6 ساعات بالدرجة 37°م. بُعِثَت العينات بواسطة ملاقط معقمة، وفُصِلَت الخلايا المتحررة من النسج اعتماداً على عدّة عمليات متعاقبة من التنفيل بسرعة 800g، واستنبتت في أطباق استنبات خلوي Tissue Culture Plates تسمح بالالتصاق؛ وذلك في الوسط DMEM + 10% FBS بدرجة حرارة 37°م وتركيز CO₂ الـ 5%، وغُدِّيَت الخلايا بتبديل الوسط كل 3-4 أيام. لدى وصولها إلى مرحلة 70%-80% من الاحتشاد Confluence، غُسِلَت الخلايا بمحلول 1xPBS، تلا ذلك إضافة أنزيم التريبسين Trypsin بتركيز 0.05% (EDTA+) وذلك مدة 5 دقائق، وتم إيقاف فعل التريبسين بإضافة وسط DMEM + 10% FBS، ووزعت الخلايا على الأطباق أو الفلاسكات الخاصة بالاستنبات.

مقايسة الاستجابة الدوائية Drug Response Assay

حُضِنَت الخلايا بعد استنباتها مع التراكيز المحددة من الأدوية الكيميائية مدة معينة، قيسَت بعدها عيوشية الخلايا بعد المعاملة بإنزيم التريبسين (0.05%) ومن ثم جُمِعَت الخلايا المتحررة إلى السائل الطافي في أنبوب إيندرورف وُقِلَّت العينات بسرعة 1500 دورة/د وإضافة 100 مكرو لتر من محلول أزرق التريبان الممدد (1:1)، ومن ثم حُدِّدَت نسبة عيوشية الخلايا بنسبة الخلايا غير المتلونة بأزرق التريبان نسبة لكامل الخلايا. من جهة أخرى،

البروتوكول التوليفي Combinatorial الأكثر نجاعةً في القضاء على الخلايا الجذعية السرطانية وغير الجذعية؛ ممّا يهدف إلى محو ذاكرة الورم المتمثلة بالخلايا الجذعية السرطانية، وبما يدعم القرار السريري لاختيار البروتوكول الدوائي التوليفي الأفضل لمعالجة مرضى السرطانات.

المواد والطرائق:**المواد والكواشف Reagents**

إشترِيَتْ أوساط الاستنبات Dublicco's Modified Eagle Medium (DMEM) منخفض تراكيز الجلوكوز ومصل الجنين البقري (FBS) Fetal Bovine Serum ومحلول Phosphate Buffered Saline (PBS) ومحلول إنزيم التريبسين 0.05% Trypsin والصادات الحيوية Penicillin/Streptomycin والغلوتامين والمضاد الفطري Amphotericin من شركة Euroclone الإيطالية، وأطباق استنبات الخلايا غير الملتصقة، وإنزيمات Collagenase/Hyaluronidase من شركة Stem Cell Technologies الكندية، وعلى محلول DMSO من شركة Sigma الأمريكية. دُرِسَت الخلايا بالمجهر المقلوب من شركة Olympus وباستخدام كاميرا توثيق خاصة. في دراسات المقاومة للمعالجات الكيميائية، استخدمت الأدوية الكيميائية التجارية Docetaxel، من شركة (Hospira)، وDoxorubicin، وEbetaxel (paclitaxel)، وCarboplatin من شركة (Ebewe). كما تم الحصول على الأدوية الميتفورمين والسيمفاساتين من صيدليات المجتمع.

الاعتيان Sampling

شملت الدراسة عينات سرطان ثدي أولي مستأصلة جراحياً من 4 مريضات حديثات التشخيص لم يخضعن بعد للمعالجة الشعاعية أو الكيميائية، راجعن مستشفى البيروني الجامعي للأورام في مدينة دمشق. وقد تم الحصول على موافقة المريضات المستتيرة قبل جمع العينات مع إغفال المعلومات الشخصية للمريضات.

استبدلت في بعض التجارب بالأوساط المغذية الحاوية على الأدوية أوساط خالية منها بعد الغسل المتكرر للخلايا بمحلول PBS، وروقيت عودة نمو الخلايا في الوسط المغذي بغياب الأدوية الكيميائية. والنقطة صور الخلايا بواسطة الكاميرا المرفقة بالمجهر المقلوب من شركة Olympus.

تكوّن الكرات الثديية Formation of Mammospheres

استئبنت الخلايا بشروط غير ملتصقة Non-adherent باستخدام أطباق استئبات خلوي فائقة القدرة على منع الالتصاق Ultra-low Adherent Plates، وروقيت نمو الكرات المتشكلة وقدرتها على التجدد الذاتي في أوساط منخفضة الالتصاق بعد حضنها مع التريسين 0.05%، وغسلها واستئباتها مجدداً في الشروط المبينة أعلاه.

الدراسة الجزيئية Molecular Study

بعد إزالة التصاق الخلايا، المستئبنة في شروط التصاقية، بالمعاملة بالتريسين (0.05%)، حُفظ ما يقرب من 200 ألف خلية في محلول RNA Later من شركة Qiagen

الألمانية واستخلص لاحقاً الرنا الكلي Total RNA من الخلايا بواسطة عتيدة لاستخلاص الرنا من شركة Qiagen، ومن ثم صنّع الدنا المتمم cDNA بوجود مرئسة من التايميدين منقوص الأكسجين dT بواسطة عتيدة مخصصة لذلك من شركة Thermo Scientific الأمريكية. أُجري تفاعل البوليميراز التسلسلي اللحظي Real-Time Quantitative PCR، أو (QPCR) بوجود خليط نكليوتيدي موسوم بصباغ SYBERGreen المفلور وإنزيم بوليميراز الدنا ومرئسات نوعية للمورثات المستهدفة، وهذه العتائد جميعها هي من شركة Thermo/Fermentas الأمريكية. وقُورنت الزيادة في الفلورة الناجمة عن تشكّل نواتج التفاعل بجهاز القياس اللحظي من شركة Spartan الكندية، وسجلت قيم دورات العتبة Cycle Threshold (C_t). استخدمت المرئسات المبينة في الجدول الآتي، التي صممت عبر برنامج PRIMER3، وصنعت من قبل شركة VPN الألمانية، لمضاعفة المورثات:

الجدول 1: المرئسات المستخدمة لمقارنة التعبير الجيني

Gene المورثة	Forward Primer المرئسة الأمامية Reverse Primer المرئسة العكسية
GAPDH	5' ggctccaaggagtaagacc 3' 5' aggggtctacatggcaactg 3'
MDR1	5' cttatgctctggcctctgg 3' 5' tgctcaatgctggagatg 3'
CD133	5' gcattggcatctctatggt 3' 5' cgcttgctctgtagtgt 3'
ALDH	5' tctogacaaagccctgaagt 3' 5' tattcgccaagcgtattc 3'

C_t للمورثة الشاهدة GAPDH من قيمة C_t للمورثة المدروسة في كل من نوعي الخلايا.

النتائج:

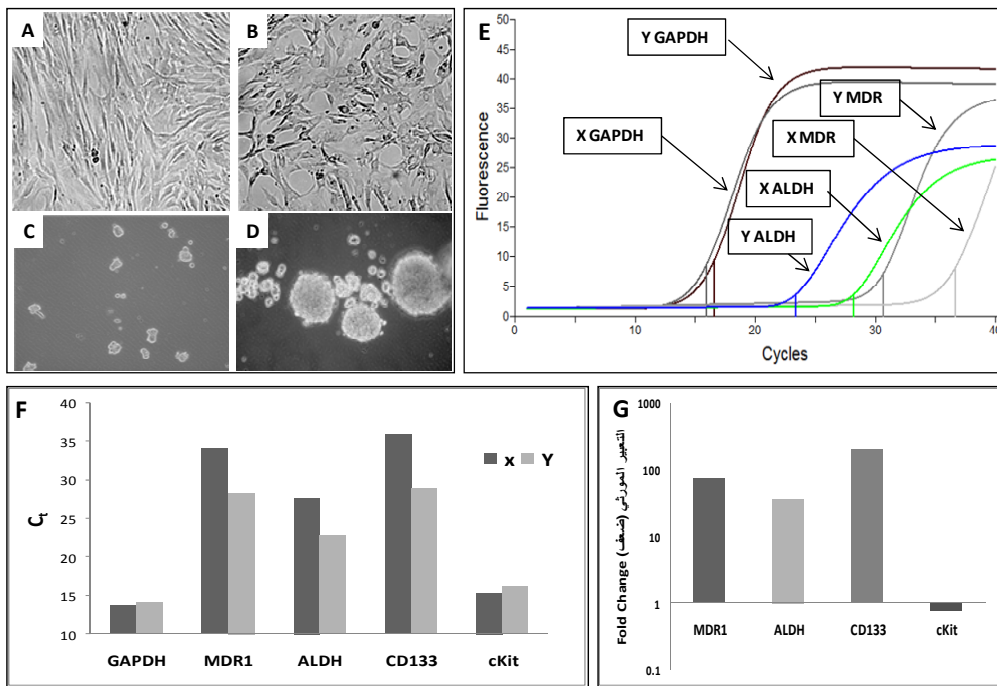
عزل الخلايا من عينات الورم الأولي

قمنا بدايةً بهضم العينات المستأصلة من أربع مريضات لسرطان الثدي، لم تخضعن للمعالجة الكيميائية أو الشعاعية، بإنزيمي الكولاجيناز والهيالورونيداز. أدت

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

استخدم اختبار T Student لمقارنة متوسطات النسب المئوية للخلايا الحية، وتقدير الفارق في عيوشية الخلايا بعد التعرض للأدوية المختلفة، وعدت قيمة P<0.05 دالة على الأهمية الإحصائية. حُسبت التغيرات في التعبير الجيني بالاعتماد على طريقة 2^{-ΔΔC_t} لحساب التغيرات المضاعفة Fold Changes، إذ تمثل هذه القيمة الفارق بين تعبير كل مورثة في الخلايا Y عنها في X، بعد طرح قيمة

المعالجة الإنزيمية إلى تحرير بعض الخلايا من العينات الأربعة للورم البدئي، لكن استبعدت عينتان منهما مباشرة نظراً للتلوث الجرثومي عند البدء باستنبات الخلايا. والتصفت الخلايا المنحرفة من عيني الدراسة المتبقيتين على سطح أطباق الاستنبات في شروط ملتصقة adherent conditions بوجود المصل الجنيني البقري وبدأت تنمو وتتقسم خلال 48 ساعة من تحضير العينات. ولدى متابعة



الشكل 1: مقارنة بين الخلايا X (BCCs) والخلايا Y (BCSCs). (A و B) مورفولوجية الخلايا X و Y، على التوالي، في شروط استنبات التصاقية Adherent (التكبير X300). (C و D) اختلاف القدرة على تشكيل الكرات الثديية/الورمية في الخلايا X و Y، على التوالي، في شروط استنبات غير التصاقية Non-adherent (التكبير X60). (E و F و G) مقارنة التعبير الجيني لأربع مورثات هي MDR1 و ALDH و CD133 و cKit (CD117) بين جمهورتي الخلايا X و Y بالمقارنة بالمورثة الشاهدة GAPDH. (E) البيانات الخام Raw Data تمثل تزايد الفلورة الناتج عن تضخيم الدنا بتفاعل بوليميراز الدنا التسلسلي اللحظي QPCR لثلاث مورثات. (F) مقارنة الدورات العتبية Cycle Thresholds لكل من المورثات الخمس المعبر عنها في كل من جمهورتي الخلايا X و Y. (G) التغيرات المضاعفة Fold Changes لكل من المورثات الأربعة في جمهرة الخلايا Y بالنسبة إلى الخلايا X، بعد تصحيح التعبير الجيني نسبة للمورثة الشاهدة GAPDH.

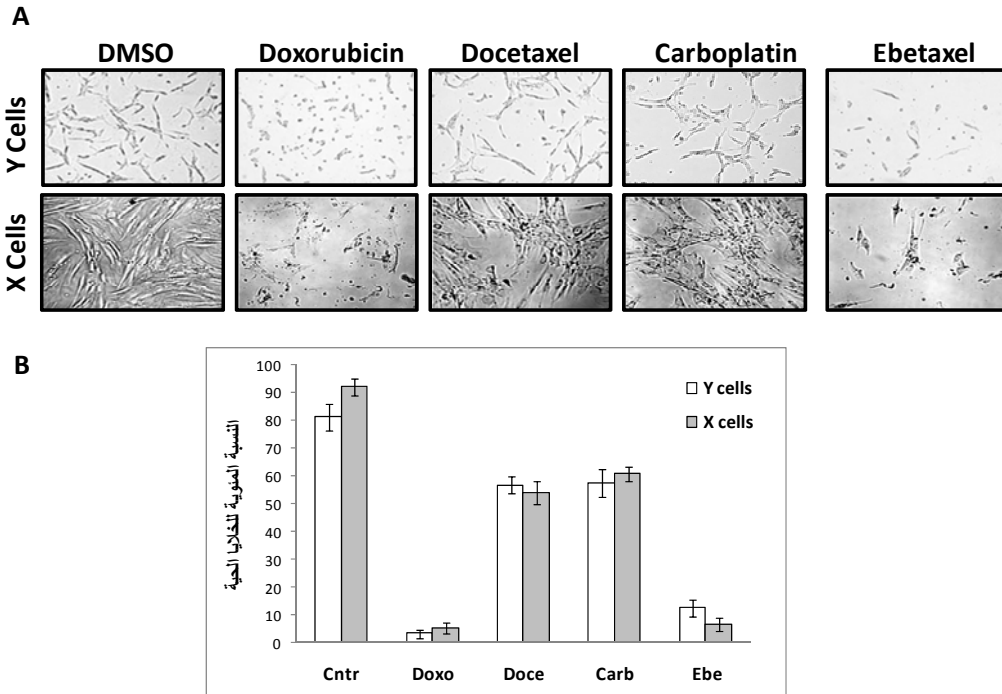
استنبات الخلايا ومقايسة التعبير الجيني
 الاحتشاد Confluence، قُسمت الخلايا بعد فك التصاقها استنبتت الخلايا واستبدل وسط الزرع الحاوي على المصل عن سطح طبق الاستنبات بإنزيم التريسين إلى ثلاثة كل 3-4 أيام خلال الأسابيع الثلاثة الأولى لتحضير العينة. وعند وصول الخلايا إلى ما يقارب 80% من أقسام. ضم القسم الأول نحو مليون خلية (الإمرار 0 Passage) حُفِظت بالآزوت السائل بوجود 10% DMSO

و50% FBS. وتابعا استنبات خلايا القسم الثاني (الخلايا X) في شروط ملتصقة بوجود المصل وتمت تغذيتها وتكثيرها باستعمال الإمرار المتوالي Serial Passaging بصورة متواترة كل 7-10 أيام مدة شهر. أمّا القسم الثالث، فقد خضع لعملية تمديد متوالي Serial Dilution في طبق استنبات يحتوي على 96 بئراً، حيث احتوى كل بئر عدداً قليلاً من الخلايا وأضيف وسط الزرع الحاوي على المصل، ورُوقب نمو الخلايا خلال أسبوعين لاحقاً للتمديد المتوالي. لوحظ في أحد الآبار وجود مستعمرة خلوية (الخلايا Y) ذات مورفولوجية خلوية تتميز عن مورفولوجية الخلايا الأولية المستخدمة التي قمنا مُدَدتْ، كما تميزت خلايا هذه المستعمرة بالنمو البطيء نسبياً. وبعد احتشاد خلايا المستعمرة السابقة في البئر ذاته نُقِلتِ الخلايا بعد المعاملة بإنزيم التريسين إلى طبق زرع T25، ورُوقب نمو الخلايا خلال شهر من الإمرار الأول. ويظهر الشكل 1 (A و B) التفاوت في مورفولوجية الخلايا التي لم تخضع للتمديد المتوالي (الخلايا X) وخلايا المستعمرة التي خضعت له (الخلايا Y) بعد الوصول إلى الاحتشاد الأعظمي لكل منهما. فضلاً عن ذلك، اتّسمت الخلايا X المستنبطة بسرعة نموها ويزمن تضاعف Doubling time بلغ 3-4 أيام، في حين راح زمن تضاعف الخلايا Y بين 7-10 أيام. وبعد الإمرار الرابع لكل من نوعي الخلايا X و Y، استنبت قسم من الخلايا في شروط لا التصاقية Non-adherent Conditions (في أطباق خلوية تمتاز بكونها منخفضة الالتصاق بصورة فائقة Ultra-low Adherent) لا تسمح بالالتصاق للخلايا. ولوحظ فارق واضح جداً في قدرة كل من نوعي الخلايا على النمو والانقسام في هذه الشروط التي كانت معاكسة لنتائج الزرع في الشروط الالتصاقية، إذ لم تتمكّن الخلايا X من النمو بشكل كبير وأعطت كتلاً خلوية صغيرة الحجم (الشكل 1 C)، في حين تكاثرت الخلايا Y بصورة أسرع وأعطت كتلاً خلوية كبيرة الحجم (كرات

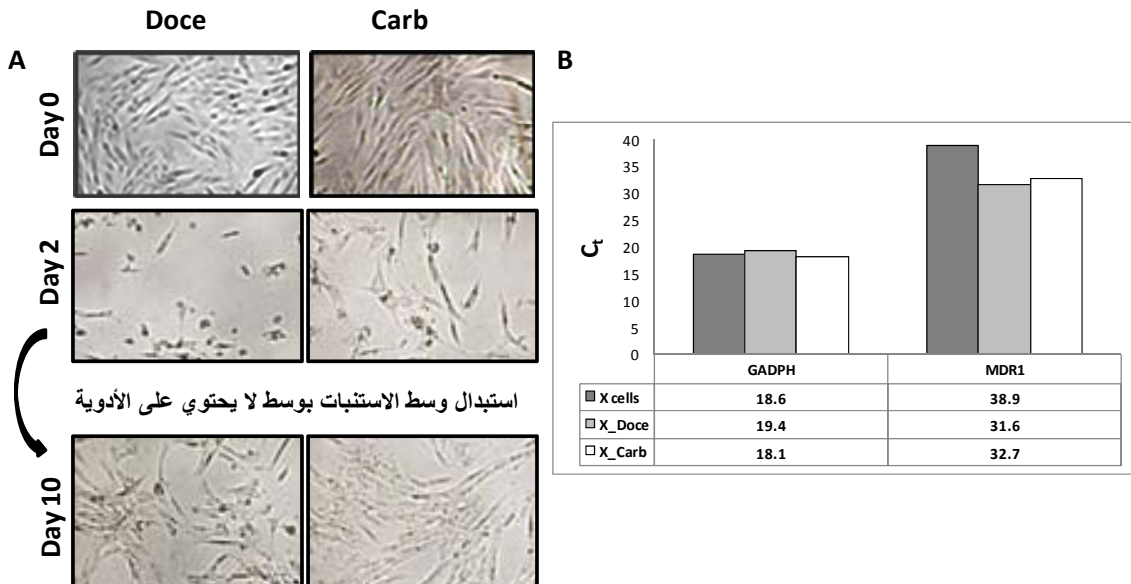
spheres) وصل قطر بعضها إلى ما يقارب 0.5 مم خلال 96 ساعة من بدء استنبات الخلايا في الشروط غير الملتصقة (الشكل 1 D). قمنا لاحقاً باستخلاص الرنا من الخلايا X و Y المستنبطة في شروط ملتصقة واصطناع الدنا المتمم cDNA ومقايسة التعبير الجيني لعدد من المورثات لتحديد الفرق بين جمهورتي الخلايا X و Y على المستوى الجزيئي. أظهرت نتائج تفاعل بوليميراز الدنا التسلسلي اللحظي QPCR زيادةً كبيرةً في التعبير عن المورثات CD133 و ALDH و MDR1 في الخلايا Y، وقد زاد التعبير الجيني لهذه المورثات الثلاث بمقدار 194، و 73، و 36 ضعفاً، على التوالي، نسبة للخلايا X، في حين انخفض التعبير الجيني لمورثة cKit إلى 0.75 ضعف في الخلايا Y بالمقارنة مع X (الشكل 1 E و F و G).

دراسة استجابة الخلايا للأدوية الكيميائية التقليدية

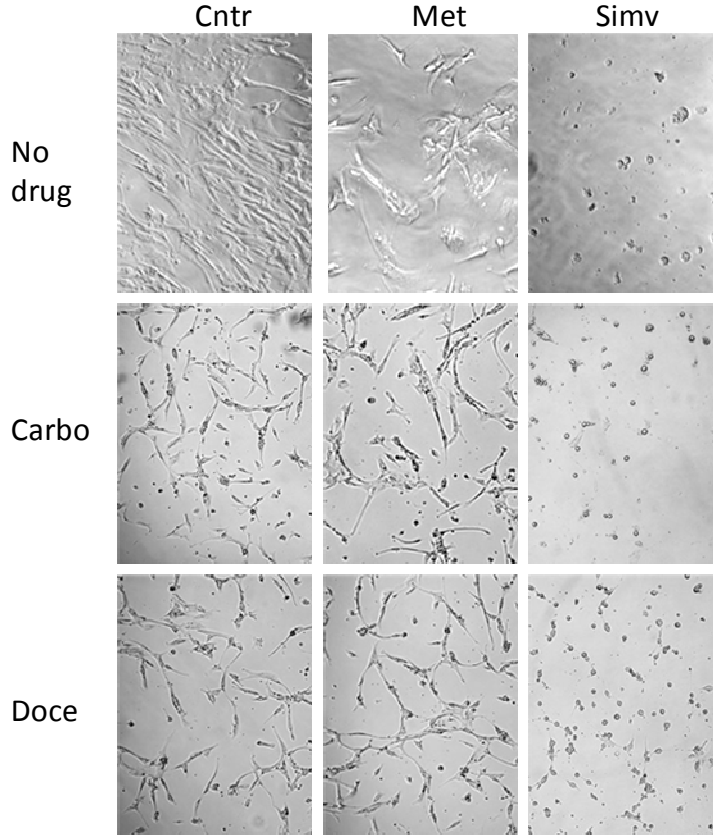
دُرست استجابة جمهورتي الخلايا X و Y لأربعة أدوية تستخدم بشكل عياري لمعالجة مريضات سرطان الثدي هي Docetaxel و Carboplatin (Carb) و Doxorubicin (Doxo) و Ebetaxel (Ebe) (19) بتراكيز 50 نانوغرام/مل لكل منها، خلال مدة حضن مع الأدوية بلغت 72 ساعة (الشكل 2 A). وبقياس عيوشية الخلايا عن طريق تحديد النسبة المئوية للخلايا غير المتلونة بأزرق التريبان، لوحظت السمية الخلوية الكبرى لكل من الدوكسوروبيسين والإبيتاكسل، اللذين تسببا في القضاء على أكثر من 90% من الخلايا، في حين بقي أكثر من 50% من الخلايا X و Y حياً، مع تغير واضح في مورفولوجية الخلايا، بعد انقضاء مدة الحضن بتأثير الكاربوبلاتين والدوسيتاكسل (الشكل 2 B) بفوارق إحصائية مهمة ($P < 0.05$) في النسب المئوية للخلايا الحية. وبشكل عام لم نجد فارقاً ملحوظاً في تأثير الأدوية الكيميائية بين جمهورتي الخلايا، إذ استجابتا كلتا جمهورتي الخلايا X و Y بشكل مماثل للأدوية الأربعة.



الشكل 2: مقارنة تأثير أربعة أدوية كيميائية بتركيز 50 نغ/مل لأي منها على جمهورتي الخلايا X (BCCs) و Y (BCSCs). (A) تأثير إضافة الأدوية على مورفولوجية الخلايا لكل من الجمهورتين X و Y. (B) النسبة المئوية للخلايا الحية بعد إضافة الأدوية الأربعة بالمقارنة بالخلايا الشاهدة غير المتعرضة لها. ويبدو في الشكل التأثير السام للخلايا الأكبر للدوائين الدوكسوروبيسين والإبيتاكسل.



الشكل 3: نموذج مخبري لنكس الورم. (A) معاودة نمو الخلايا X (BCCs) بعد تعرضها لتركيز 100 نغ/مل من الدوسيتاكسيل (Doce) أو الكاربوبلاتين (Carb). (B) أظهرت النتائج ارتفاع التعبير الجيني لمورثة MDR1 المستقر من انخفاض الدورة العتبة Ct في الخلايا المعالجة بالدوسيتاكسل أو الكاربوبلاتين بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة غير المعالجة بالأدوية (X cells).



الشكل 4: مورفولوجية الخلايا Y أو (BCSCs) الناتجة عن إضافة 1 ميلي مول / ل من الميتفورمين أو 20 ميكرو مول / ل من السمفاساتين، دون إضافة 50 نانوغرام / مل من الكاربوبلاتين أو الدوسيتاكسل، أو مع إضافته بالمقارنة بالخلايا التي لم تتلق أي معالجة دوائية أو تلقت المعالجة بالكاربوبلاتين أو الدوسيتاكسل بشكل مفرد.

نموذج في الزجاج لنكس الورم Tumor Relapse

بناءً على نتائج الاستجابة الخلوية السابقة للأدوية الكيميائية، اخترنا تطبيق الدوسيتاكسل (Doce) والكاربوبلاتين (Carb) على جمهرة الخلايا X لقياس التعبير الجيني لإحدى المورثات المهمة في مقاومة الأدوية؛ وهي MDR1 بعد التعرض للدوائين. فكان أن عرّضنا الخلايا X إلى تركيز 100 نغ/مل من كل من الدوائين على حدة مدة 48 ساعة بوجود المصل، استبدل بعدها بالوسط الحاوي على الأدوية بوسط نمو جديد خالٍ من الأدوية، وثركت الخلايا لثمانية أيام في وسط النمو الجديد بوجود المصل، ومن ثمّ جمعت الخلايا التي عاودت النمو عبر معاملتها بالتريسين واستخلص الرنا وقيس التعبير الجيني لمورثة MDR1 بالمقارنة بالمورثة الخدمية الشاهدة في كل من الخلايا X التي تعرّضت للدوسيتاكسل أو الكاربوبلاتين أو التي لم تتعرض لأي منهما كخلايا شاهدة. أظهرت النتائج ارتفاع التعبير الجيني لمورثة MDR1 في كلتا جمهورتي الخلايا X المتعرضتين بالدوائين الكيميائيين بالمقارنة بالخلايا الشاهدة، في حين كانت مستويات التعبير عن المورثة الخدمية الشاهدة متساوية تقريباً (الشكل 3).

دراسة استجابة الخلايا المستنبّطة لتوليفات دوائية

دُرِس تأثير كل من الميتفورمين (1 ميلي مول/ل) والسمفاساتين (20 ميكرومول/ل) في جمهرة الخلايا Y. وقيس تأثير إضافة الدوائين دون إضافة 50 نانوغرام/مل أو مع إضافتها إلى كلٍّ من الكاربوبلاتين أو الدوسيتاكسل بعد

مبدأ المعالجات الفردانية Personalized Therapies لكل مريضة على حدة. ويضمن العلاج الأمل للبقاء على الورم لديها. وقد أظهرت نتائج هذا البحث تمكّنا من عزل خلايا من إحدى العينات المأخوذة تمتعت بقابلية الالتصاق والتكاثر بزمن تضاعف من 3-4، أيام واستمرت في تكاثرها أكثر من 10 إمرارات، ممّا يدل على خصائصها الورمية، إذ تفقد الخلايا غير الورمية سريعاً كمونها التكاثري وتخضع للاستموات Apoptosis بعد إمرارين أو ثلاثة كحد أعظمي. وأطلقنا على هذه الخلايا X بالخلايا السرطانية الثديية أو BCCs. إلى جانب ذلك، تمتعت الخلايا Y، التي نجحنا في عزلها من ضمن جمهرة الخلايا X بعملية التمديد المتوالي، بسعة تكاثرية أقل من تلك المشاهدة لدى الخلايا BCCs وبزمن تضاعف 7-10 أيام، مع كون مورفولوجية الخلايا مختلفة في كلتا الجمهرتين الخويتين. وعند زرع الخلايا X و Y في شروط غير ملتصقة أبدت الخلايا Y فقط القدرة على تشكيل الكتل الخلوية الشبيهة بالكرات الثديية Mammospheres؛ وهي خاصية مهمة ونوعية للخلايا الجذعية لسرطان الثدي⁷، ممّا حدا بنا بداية إلى تصنيف الخلايا Y على أنها خلايا جذعية سرطانية ثديية BCSCs. ويمكن تفسير عدم ظهور الكرات الثديية في جمهرة الخلايا X مع أنها تتضمن الخلايا Y المولدة لهذه الكرات، بأن الخلايا Y تشكّل نسبة قليلة جداً من الخلايا X، خاصة بعد الإمرار الرابع حين أجريت التجارب، إذ تقلّ نسبة الخلايا Y كثيراً نظراً للسعة التكاثرية الصغيرة لها بالمقارنة بالخلايا X سريعة التكاثر، الأمر الذي ربما قد ألغى مشاركة الخلايا القادرة على تشكيل الكرات الثديية في هذه الجمهرة الأخيرة.

وقد جاءت نتائج مقايسة التعبير الجيني متوافقة مع تصنيفنا للخلايا Y على أنها BCSCs، إذ عبّرت هذه الخلايا تعبيراً كبيراً عن المورثات MDR-1 و ALDH و CD133 بالمقارنة بالخلايا X أو BCCs، وهو ما يتماشى مع مرتسم profile

حضان الخلايا مع الأدوية مدة 72 ساعة في وسط الاستنبات بوجود المصل (الشكل 4). أظهرت إضافة السمفاساتين فقط التأثير السمي الأكبر للخلايا، حيث تم قتل أكثر من 90% من الخلايا بعد قياس العيوشية بأزرق التريبان، في حين بقيت عيوشية الخلايا نحو 60% بعد إضافة الميتفورمين. وبينما لم يظهر تأثير تآزري واضح لإضافة السمفاساتين بوجود أي من الدوسيتاكسل أو الكاربولاتين بسبب السمية الخلوية العالية للسمفاساتين وحده، فقد انخفضت عيوشية الخلايا عند إضافة الدوسيتاكسل أو الكاربولاتين مع الميتفورمين لتصبح أدنى من 50% دون وجود فارق إحصائي جوهري ($P < 0.05$).

المناقشة:

على الرغم من فعالية المعالجات الكيميائية والشعاعية في الحد من تكاثر الخلايا الورمية لسرطان الثدي وانتشارها وأحياناً النجاح في استئصال الأورام كلياً، فإن نسبة غير قليلة من المريضات إمّا لا يستجبن للمعالجات الكيميائية التقليدية، أو بصينّ ينكس الورم لديهن بعد استجابة أولية جزئية Partial Primary Response²⁰. وهنا تبرز أهمية اختيار التوليفة الدوائية الكيميائية المثلى في القضاء على الخلايا السرطانية كلياً، بحيث لا تعود هذه الخلايا إلى النمو مجدداً مؤديةً إلى النكس. وحديثاً أثمرت الخلايا الجذعية السرطانية بأنها المسؤولة بشكل مباشر عن عودة النكس، إذ لا تستجيب الخلايا للمعالجات الكيميائية وتبقى هامة عدة شهور إلى أن تمدّ الورم من جديد بالخلايا ذات السعة التكاثرية العالية²¹.

أجريت هذه الدراسة المخبرية بهدف دراسة السلوك التكاثري لخلايا معزولة من عينات أولية لسرطان الثدي لمريضات غير معالجات، وتحديد الاستجابة الخلوية في المختبر لعدد من الأدوية الكيميائية، في الطريق لتأسيس نموذج مخبري في المختبر *in vitro* لاختبار فعالية الأدوية على الخلايا السرطانية المعزولة من عينات الأورام الأولية، وبما يؤمن

تسمح بتطبيق الاختبارات الدوائية. ومع أن هذا الزمن قد يبدو طويلاً نسبياً لاختيار التوليفة الدوائية المثلى للبدء في المعالجة التحريضية Induction Therapy لدى مريضات سرطان الثدي، إلا أنها قد تسمح أمثلة شروط العزل والاستنابات بتقصير المدة إلى أسبوعين، وهو على الأقل زمن كافٍ لتكاثر الخلايا BCCs ذات زمن التضاعف القصير.

وبسبب الاستجابة الجزئية لخلايا BCCs لل Docetaxel و Carboplatin، صممت تجربة تالية تُحاكي فيما نعتقد نموذجاً لنكس الورم، في محاولة منا لتحديد الاختلاف الذي يطرأ على الخلايا الورمية التي قاومت تأثير الأدوية الكيميائية على المستوى الجزيئي. واخترنا لذلك دراسة التعبير الجيني لإحدى أهم المورثات في مقاومة الأدوية، MDR-1، في خلايا BCCs غير معالجة بالمقارنة بخلايا BCCs انخفضت عيوشيتها لأقل من 20% بعد تعرضها لتركيز مرتفع (100 نغ/مل) من الـ Doxo و Carbو مدة 48 ساعة، وعادت لتنمو من جديد بعد استبدال بوسط النمو الحاوي على الأدوية آخر خالٍ منها. وبيّنت النتائج ارتفاع التعبير الجيني عن مورثة MDR-1 في الخلايا التي عادت للنمو بعد التعرض لكل من الدواءين بالمقارنة بخلايا BCCs الشاهدة. يمكن تفسير هذه النتيجة بأحد احتمالين؛ الأول ارتفاع التعبير الجيني لمورثة MDR-1 في خلايا BCCs نفسها بعد تعرضها للأدوية الكيميائية، الأمر الذي يتوافق مع ما ذكر سابقاً في الأدبيات الطبية عن ارتفاع التعبير عن عدد من المورثات المقاومة للأدوية؛ ومن أهمها MDR1^{27,28}. أمّا الاحتمال الثاني فربما يكمن في زيادة تواتر الخلايا الجذعية السرطانية BCSCs ضمن جمهرة الخلايا السرطانية المختلطة BCCs بعد المعالجة الكيميائية التي يفترض أنها تستهدف الخلايا السرطانية ذات السعة التكاثرية العالية. بينما قد توقّر المعالجة الخلايا BCSCs ذات السعة التكاثرية الأخفض التي يكون قسم كبير منها

التعبير الجيني لخلايا BCSCs الذي تم توثيقه سابقاً^{25,22}. في المقابل، وجدنا انخفاضاً في التعبير عن المستضد السطحي cKit أو (CD117) في خلايا BCSCs بالمقارنة بخلايا الورم المختلطة BCCs، الأمر الذي يتفق أيضاً مع ما أشير إليه سابقاً عن انخفاض التعبير عن هذا البروتين عند تحول الخلية الجذعية البالغة إلى خلية جذعية سرطانية في أورام الثدي²⁶.

أجرينا لاحقاً تجربة غربلة للأدوية Drug Screening للتحقق من استجابة الخلايا BCSCs و BCCs لأربعة من الأدوية المستخدمة في علاج سرطان الثدي. ووجدنا أن كلتا جمهورتي الخلايا استجابتا بشكل مماثل تقريباً للأدوية الأربعة. وكان أكثر الأدوية تأثيراً هو الدوكسوروبيسين تلاه الإبيتاكسل اللذان قضا على أكثر من 90% من الخلايا BCSCs و BCCs خلال 72 ساعة من الحضان مع الأدوية، في حين حافظ أكثر من 50% من خلايا كلتا الجمهورتين على عيوشيتها خلال المدة استجابةً للدوسيتاكسل والكاربوبلاتين نفسها. ومن المثير للاهتمام، أن الاستجابة الدوائية لكل من الدوسيتاكسل والإبيتاكسل قد اختلفت اختلافاً كبيراً على الرغم من انتماء الدواءين للزمرة الكيميائية نفسها. وعموماً، تظهر هذه النتائج اختلاف الاستجابة الخلوية للأدوية الكيميائية بصورة جوهرية باختلاف الدواء المستخدم حتى لو انتمت بعض الأدوية للزمرة نفسها، مما قد يكون له تطبيقات سريرية مهمة. وهو ما يشبه بالواقع اختبار التحسس للصادات الحيوية المطبق بشكل واسع مخبرياً والمستخدم في غربلة الأدوية الملائمة لقتل الجراثيم واتخاذ القرار العلاجي الملائم لمريضى الإنتانات. أمّا من حيث المدة الزمنية لتطبيق اختبار التحسس للأدوية الكيميائية في حالة الخلايا السرطانية، فيمكن تطبيق الاختبار نظرياً خلال أقل من شهر واحد من تاريخ استئصال عينة ورم الثدي، وهو الزمن اللازم لعزل الخلايا واستناباتها وتكاثرها في الزجاج ووصولها إلى تراكيز

حديثاً دور الميتفورمين، المعروف بتأثيره الدوائي الخافض لسكر الدم عن طريق زيادة حساسية مستقبلات الإنسولين واستطبابه عند مرضى الداء السكري من النمط الثاني، في تثبيط نمو الخلايا السرطانية الثديية. وجاءت أولى المشاهدات من عدد من الدراسات حالة/شاهد Case-Control التي أظهرت تأثيراً واثقاً للميتفورمين من حدوث سرطان الثدي لدى المريضات السكريات المعالجات بالميتفورمين^{15,32}. زيادةً على ذلك، أظهرت دراسة أخرى حديثة أن معدل الاستجابة المرضية الكاملة Complete Pathological Response لدى مريضات سرطان الثدي السكريات Diabetics ممن يتناولن الميتفورمين بلغ 24%، بمقابل 8% فقط لدى اللواتي لا يتناولنه³³. وأجريت منذ ذلك الحين عدة تجارب في الزجاج وداخل العضوية أكدت دور الميتفورمين الإيجابي في معالجة سرطان الثدي³⁴⁻³⁶. أما الآليات المقترحة لتأثير الميتفورمين فتكون إما عن طريق خفض غلوكوز وإنسولين الدم وتثبيط السبيل الإشاري Insulin/Insulin Growth Factor 1 (IGF1) المعتمد على الإنسولين، أو خفض السيبتوكينات الإتهابية كالانترلوكين 6 (IL6) وعامل النخر الورمي (TNF) وعامل النمو البطاني الوعائي (VEGF)؛ ممّا يؤدي إلى تثبيط نمو الخلايا وتكاثرها، أو بشكل مباشر عبر تنشيط البروتين الكابح للورم LKB1^{36,34,15}. كذلك الأمر بالنسبة إلى الستاتينات، العوامل الفعالة دوائياً في خفض كولسترول الدم. فقد وجدت دراسة حديثة لدى مرضى شخّصوا بالإصابة بواحد من بين 13 نوعاً من السرطانات بين العامين 1995 و 2007 أن تناول الستاتينات قد خفض الوفيات المتعلقة بالسرطان بنسبة 15%³⁷، الأمر الذي أدى إلى الشروع بأكثر من 18 تجربة سريرية لاستخدام الستاتينات في الوقاية من السرطانات منذ العام 2010³⁸. والستاتينات هي مثبطات تنافسية لإنزيم HMGCR المحدد لمعدل الاصطناع الخلوي للكولسترول، وهو المكوّن الأساسي في الأغشية الخلوية.

هامداً غير منقسم، ومن ثمّ لا يُستهفّف من قبل الأدوية الكيميائية. وتدعم هذه النتائج أهمية هذا النموذج لاستنبات الخلايا السرطانية الثديية في الزجاج وإمكانية اختبار معالجات دوائية كيميائية أو معالجات توليفية لاختبار البروتوكولات العلاجية الأكثر نجاعةً في القضاء على كلا نوعي الخلايا السرطانية الثديية والخلايا الجذعية السرطانية، الأمر الذي أكّدت ضرورته دراسات عديدة حديثة للقضاء الكامل على الأورام والتقليل من إمكانية حدوث النكس²⁹.

وأخيراً، وبسبب مقاومة الخلايا BCSCs للأدوية الكيميائية التقليدية، دُرِس في هذا البحث تأثير دوائين آخرين على هذه الخلايا لهما استطبابات لا تتعلق بشكل مباشر بسرطان الثدي، هما الميتفورمين والسفمستاتين، دون وجود 50 نانوغرام/مل من الـ Doxo أو Carb. أو مع وجوده واختير تركيز 1 ميلي مول/ل للميتفورمين و20 مكرو مول/ل للسفمستاتين بناءً على التراكيز المتوقعة لكل من الدوائين في الدم بعد تناول جرعة دوائية عيارية واحدة من كلّ منهما، فضلاً عن قرب هذين التركيزين من التراكيز المستخدمة في دراسات مشابهة^{30,31}. أظهرت الخلايا BCSCs استجابة شبه تامة للسفمستاتين الذي قضى على معظم الخلايا خلال 72 ساعة من الحضان. ونتيجة لذلك، لم يظهر أي تأثير تآزري سام للخلايا لدى مشاركة كل من Doxo أو Carb مع السفمستاتين. أمّا لدى استخدام الميتفورمين وحده، فقد انخفضت عيوشية الخلايا نحو 40%، وانخفضت أكثر، نحو 50%، عند مشاركة الميتفورمين مع أي من Doxo أو Carb، ممّا قد يدل على تأثير تآزري بين الميتفورمين والأدوية الكيميائية. ومع أن الميتفورمين والسفمستاتين لا يستخدمان حالياً ضمن البروتوكولات الدوائية لعلاج مريضات سرطان الثدي، يبدو أن كلا الدوائين واعددين جداً لإدراجهما في التطبيقات العلاجية المستقبلية لهذه الجمهرة من المرضى. وقد وثّق

فإن تحديد خلايا بذاتها، هي الخلايا الجذعية السرطانية، قد يجعل مهمة التعامل مع الأورام أسهل فيما لو تم تحديد طبيعة هذه الخلايا وأساس نشوئها، مما يمهد الطريق لاستهدافها بشكل مباشر وفعال. وهنا تبرز أهمية البحوث الهادفة إلى عزل الخلايا الجذعية السرطانية، ودراسة سلوكها التكاثري ونخل/غريلة مشاركات علاجية جديدة قادرة على قتل هذه الخلايا بصورة نوعية وتفضيلية وتطويرها، جنباً إلى جنب مع المعالجات المستصلحة للخلايا الورمية الأخرى الناتجة عنها. وقد حاولنا في بحثنا هذا تسليط الضوء على مفهوم الخلايا الجذعية السرطانية من خلال عزل هذه الخلايا من عينات أولية لسرطان الثدي وتوصيفها جزئياً، ودراسة استجابة هذه الخلايا لعدد من الأدوية الكيميائية المستخدمة بشكل روتينياً في علاج مريضات سرطان الثدي فضلاً عن أدوية أخرى تعدد في حال نجاحها في التجارب السريرية الجارية حالياً، باستئصال هذه الخلايا عند مشاركة هذه الأدوية الأخيرة في بروتوكولات العلاج المعتمدة للمرضى.

الاستنتاجات والتوصيات:

يشكل هذه البحث خطوة أولية تمكناً من خلالها من توطيد تقانة عزل الخلايا الجذعية السرطانية لسرطان الثدي واستعمالها كنموذج تطبيقي لنخل عوامل دوائية كيميائية متعددة، أو كنموذج لاختبار مشاركات وتوليفات علاجية لأدوية متوقرة ومستعملة حالياً في البروتوكولات المعتمدة لتدبير هذه السرطانات. ونعتقد أنه بالإمكان تطبيق البروتوكول ذاته لعزل الخلايا الجذعية السرطانية وتكثيرها من أنواع أخرى من عينات الأورام الصلبة مثل سرطان الرئة أو القولون. فضلاً عن ذلك، قدّمنا في هذا البحث بروتوكولاً محتملاً لمحاكاة نكس الورم الحاصل في العضوية، يمكن إتباعه وتطبيقه مخبرياً لتوصيف الخلايا المعنّدة على المعالجات التحريضية المقترحة للمرضى، ومحاولة تعرّف الأدوية الأكثر فعالية في التخلص من

وتحتاج الخلايا السرطانية سريعة الانقسام إلى كميات كبيرة من الكولسترول لبناء أغشيتها، ومن ثمّ فإن خفض كل من اصطناع الكولسترول، الذي ينعكس على خفض الكولسترول في الدوران، يحرم الخلايا السرطانية من مصدر مهم تستخدمه في بناء أغشيتها الخلوية. فضلاً عن ذلك، أشارت دراسات أخرى إلى أن السمفاستاتين يثبّط التعبير عن المستضد CD44 المسؤول عن هجرة الخلايا الجذعية السرطانية وتشكيلها للنقائل، كما يزيد من تحسيس الخلايا الجذعية السرطانية الثديية للمعالجة الشعاعية^{17,18,37,38}. ويمكن تفسير نتائج تأثير الميتفورمين والسمفاستاتين في دراستنا بأي من الآليات السابقة المقترحة التي تعمل على مستوى السبل الإشارية داخل الخلوية.

إن التقدّم المتسارع الذي يشهده حقل الأورام، سواءً من حيث التعمق في تحديد آليات نشوئها وتطوير أساليب تشخيصها، أم في تطوير معالجات نوعية مستهدفة للخلايا الورمية على أساس فردي، ذلك كلّه يعدّ بتحقيق كفاءة عالية في علاج الأورام ويهبّ الأمل لملايين من مرضى السرطان، كما يسهم في خفض التكاليف الباهظة والآثار الاجتماعية المترافقة معه. ويعدّ مفهوم تراتبية الخلايا الورمية وتعريف الخلايا الجذعية السرطانية على أنها الخلايا المنشئة للورم Tumor Initiating Cells من أكثر المفاهيم الواعدة وأهمها بتطوير أساليب التعامل مع الخلايا الورمية واستهدافها. فطوال العقود الماضية، كان هدف المعالجات المختلفة للأورام هو استئصال الخلايا سريعة الانقسام على أساس أن الورم يتألف من خلايا متغايرة تتراكم فيها الطفرات عشوائياً مؤديةً إلى استحالة Transformation جمهرات من الخلايا المتميزة في الجسم وعودتها إلى الانقسام السريع المتكرر. ومن هنا، شكّل التعامل مع تغايرية الخلايا المسببة للورم تحدياً كبيراً لتطوير معالجات توليفية Combinatorial Therapies تكون قادرة على استهداف الخلايا الورمية جميعها على اختلاف أنواعها لاستئصال الورم. ومن ثمّ،

الخلايا الناتجة عن نكس الأورام. وأخيراً، وفيما لو ثبتت تكون معدومة لديهم؛ ممّا قد يجعل النافذة العلاجية نجاعة كل من الميتفورمين والسمفاستاتين في استهداف الخلايا الجذعية السرطانية في الدراسات السريرية العالمية الجارية حديثاً، فإنّ ذلك يعدّ ربما التطور الأهم في علاج السرطانات، خاصّةً أن كلا الدوائين استخدمتا ومدة عقود من قبل أعداد غفيرة من المرضى، وأظهرتا سميّة دوائية تكاد

References

1. Analysis of current status of health sector. (2011) Health research strategic planning team. Higher Commission for Scientific Research. Damascus, Syria.
2. Bertos NR, and Park M. (2011) Breast cancer: one term, many entities. *The Journal of Clinical Investigation* 121(10):3789-3796.
3. Dick JE. (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112: 4793-4807.
4. Visvader JA, and Lindeman GJ. (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 10: 717-728.
5. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, and Eaves CJ. (2012) Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature Reviews (Cancer)*, 12: 133-143.
6. Bapat S, Collins A, Dean M, et al. (2009) Cancer stem cells: similarities and variation in the theme of normal stem cells. P. 1-26. In. *Cancer Stem Cells: identifications and targets*. Edited by Sharmila Bapat. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
7. Gold B, and Dean M. (2009) Breast cancer stem cells. P.176-192. In. *Stem cells and cancer*. Edited by Sadhan Majumder. Springer Dordrecht, Heidelberg, Germany.
8. Bonnett D, and Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as hierarchy that originates from primitive hematopoietic cells. *Nature Medicine*, 3(7): 730-737.
9. Saxena M and Rangarajan A. (2009) Isolation and characterization of breast and brain cancer stem cells. P. 57-63. In. *Cancer Stem Cells: identifications and targets*. Edited by Sharmila Bapat. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
10. Kakarala M, and Wicha MS. (2008) Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J. Clinical. Oncology*; 26: 2813-2828.
11. Vezoni LK, and Parmiani G. (2008) Limitations of the cancer stem cell theory. *Cytotechnology*, 58: 3-9.
12. Dean M, Fojo T, and Bates S. (2005) Tumor stem cells and drug resistance. *Nature Reviews (Cancer)*, 5: 275-284.
13. Patel SA, Ndashaliye A, Lim PK, Milton R, and Rameshwar P. (2010) Challenges in the development of future treatments for breast cancer stem cells. *Breast Cancer*; 2: 1-11.
14. Abdullah LN, and Chow EK. (2013) Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* 2:3-12.
15. Bao B, Azmi AS, Ali S, Zaiem F, Sarkar FH. (2014) Metformin may function as anti-cancer agent via targeting cancer stem cells: the potential biological significance of tumor associated miRNAs in breast and pancreatic cancers *Ann Transl Med* 2014;2(6):59.
16. Jiang P, Mukthavaram R, Chao Y, et al. (2014) In vitro and in vivo anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *British Journal of Cancer* 111, 1562–1571.
17. Mandal CC, Ghosh-Choudhury N, Yoneda T, et al. (2011) Simvastatin Prevents Skeletal Metastasis of Breast Cancer by an Antagonistic Interplay between p53 and CD44. *J Biol Chem* 286(13): 11314–11327.
18. Lacerda L, Reddy Jp, Liu D, et al. (2014) Simvastatin Radiosensitizes Differentiated and Stem-Like Breast Cancer Cell Lines and Is Associated With Improved Local Control in Inflammatory Breast Cancer Patients Treated With Postmastectomy Radiation Stem Cells *Translational Medicine* 3:849–856.
19. Guidelines for treating cancer patients in Al-Beirouni Hospital. Al-Beirouni Oncology University Hospital, Damascus, Syria.
20. Coleman RE, Bertelli GT, Beamont Z, et al. (2011) UK guidance document: treatment of metastatic breast cancer. *Clinical Oncology*: 1-8.

21. Nicolini A, Ferrari P, Fini M, Borsari V, et al. (2011) Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol*, 12(2):196-205.
22. The Cancer Genome Atlas Network. (2013) Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 490:61-70.
23. Phuc PV, Nhan PLC, Nhung TH, et al. (2011) Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44+CD24- breast cancer cells. *Onco Targets and Therapy*; 4: 71-78.
24. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. (2009) Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research*; 69: 1302-1313.
25. Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, et al. (2009) Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One*, 4(12): e8377.
26. Kondi-Pafiti A, Arkadopoulos N, et al. (2010) Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori*, 96(6): 978-84.
27. Tang D. (2012) Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 22:457-472.
28. Guzman ML, and Allan JN. (2014) Leukemia Stem Cells in Personalized Medicine *Stem Cells*, ; 32(4): 844-851.
29. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. (2009) Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138(4):645-59.
30. Hirsch HA, Iliopoulos D, and Struhl K. (2012) Metformin inhibits the inflammatory response associated with cellular transformation and cancer stem cell growth *PNAS Early Edition* | 1 of 6.
31. Rennó AL, Alves-Júnior MJ, Rocha RM et al. (2015) Decreased expression of stem cell markers by simvastatin in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced breast cancer *Toxicol Pathol.*, 43(3):400-10.
32. Martin-Castillo B, Dorca J, Vazquez-Martin A, et al. Incorporating the antidiabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab: an ongoing clinical translational research experience at the Catalan Institute of Oncology. *Ann Oncol* 2010;21:187-9.
33. Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3297-302.
34. Barbieri F, Thellung S, Ratto A, et al. (2015) In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: translational implications for human tumors. *BMC Cancer* 15:228
35. Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Lamb R, et al. (2013) Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth Understanding chemoprevention with metformin *Cell Cycle* 12:1, 172-182.
36. Zhu P, Davis M, Blackwelder AJ, et al. (2014) Metformin Selectively Targets Tumor-Initiating Cells in ErbB2-Overexpressing Breast Cancer Models *Cancer Prev Res (Phila)* 7(2): 199-210.
37. Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE (2012) Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med* 367: 1792-1802.
38. Clendening JW, Penn LZ (2012) Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene* 31: 4967-4978.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2016/02/08.

تاريخ قبوله للنشر 2016/05/12.