

XƏRÇƏNG KÖK HÜCEYRƏLƏRİ VƏ EPİTELİAL-MEZENXİMAL KEÇİD PROSESİ ARASINDA QARŞILIQLI ƏLAQƏ

İsayev O.R.*

*E-mail: isayev.orkhan@amu.edu.az

*Azərbaycan Tibb Universiteti, histologiya, embriologiya və sitologiya kafedrası.
Bakı, Azərbaycan;
Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası. Genetik Ehtiyatlar İnstitutu. Bakı,
Azərbaycan*

Mədəltı vəzi xərcəngi (MVX) dünyada xərcəng xəstəliyi səbəbindən ölümlər arasında 4-cü yeri tutur. Dünyada hər il MVX-dən təxminən 227000 insan dünyasını dəyişir. Bu xəstəliyin aqressiv gedişinin səbəbi gec diaqnoz olunması, spesifik markerlərin olmaması, yüksək residiv vermə qabiliyyəti və kimyəvi terapiyaya qarşı yüksək rezistentlikdir. Son illər xərcəng xəstəliyi zamanı kimyəvi terapiya və metastaz kimi proseslərə cavabdeh hüceyrələrin xərcəng kök hüceyrələri (XKH) olması nəzəriyyəsi çox aktualdır. Bu nəzəriyyə əsasən, XKH ümumi şiş hüceyrələrinin 1% qədərini təşkil edir və yüksək özünü yeniləmə, həmçinin, yeni şiş hüceyrələrinə başlanğıc vermə qabiliyyətinə malikdirlər. Xərcəng xəstəliyinə xas olan proseslərdən biri də, metastaz prosesidir və bunun əsasında epitelial-mezenximal keçid prosesi durur. Müasir fikirlərə əsasən, xərcəng xəstəliyinin müalicəsində ilk növbədə hədəf XKH seçilməlidir. Bununla da, həm kimyəvi terapiyaya qarşı davamlılıq probleminin, həm də metastaz vermənin üstəsindən gəlinə bilər.

Açar sözlər: mədəltı vəzi xərcəngi, epitelial-mezenximal keçid, xərcəng kök hüceyrələri, markerlər.

Xərcəng xəstəliyi dünyada insan ölümünün səbəbləri arasında qabaqcıl yerlərdən birini tutur. Onkologiya sahəsində aparılan elmi tədqiqatların həcminə və sayının çox olmasına baxmayaraq, bu xəstəliyin müalicəsi hələ də, arzu olunan səviyyədə deyildir. Dünyada hər il mədəltı vəzi xərcəngindən (MVX) təxminən 227000 insan dünyasını dəyişir. Statistika nəzər yetirsək, MVX Amerika Birləşmiş Ştatları kimi dünyanın inkişaf etmiş ölkəsində xərcəng səbəbindən ölümlər arasında 4-cü yeri tutur və ehtimal olunur ki, 2030-cu ildə xərcəng səbəbindən ölümlər arasında 2-ci yeri tutacaqdır. Diaqnoz olunan anda xəstələrin yalnız 20 faizi operabel vəziyyətdə olurlar və 40 faiz xəstədə isə artıq uzaq metastazlar müşahidə olunur. Son 5 ildə MVX-də tətbiq olunan müalicə metodlarının, xüsusilə də, radioterapiya, kimyəvi dərman terapiyası və immunoterapiya sahəsində əldə olunan inkişafa baxmayaraq, diaqnoz olunduqdan sonra yalnız xəstələrin 24 faizi 1 ildən çox sağ qalır. Ümumi xəstələrin isə yalnız 5 faizinin 5 ildən çox yaşayacağı ehtimal olunur [1, 2].

Xəstəliyin gec diaqnoz olunması, spesifik markerlərin olmaması, yüksək residiv vermə qabiliyyəti və kimyəvi terapiyaya qarşı yüksək rezistentlik bu xəstəliyin ən qabarıq xüsusiyyətləridir. Hazırda, MVX-nin standart müalicəsi cərrahi müdaxilə və gemitabin preparatı sayılır. Gemistabin preparatı 1997-ci ildən bu xəstəlikdə tətbiq olunur, diaqnoz olunan xəstələrin yalnız 6 faizi bu preparata müsbət cavab verir və orta yaşama müddətini yalnız 6 ay artırır. Müasir dövrdə gemitabin olmayan müalicə rejimlərindən olan FOLFİRİNOX orta yaşama müddətinin 6 aydan 11 aya kimi artırır, yüksək toksiki təsir ilə müşayiət olunur [3]. Dünyada xərçəng xəstəliyinin əsasında xərçəng kök hüceyrələrinin (XKH) olması ehtimal olunur və bəzi xərçəng növlərində (süd vəzisi, qaraciyər, bağırsaq, ağciyər, uşaqlıq, prostat, mədəaltı vəzi və s.) eksperimental yolla sübuta yetirilib. XKH ümumi şiş kütləsinin 1 faizə qədərini təşkil edir. Bu hüceyrələrin əsas xüsusiyyəti özünü yeniləmə qabiliyyəti və yeni şiş hüceyrələrinə başlanğıc vermə qabiliyyətidir. Həmçinin, XKH-nin mədəaltı vəzi xərçəngində kimyəvi terapiyaya rezistentlik və metastaz vermə proseslərinə cavabdeh olduğu müəyyən edilmişdir. Mədəaltı vəzi xərçəng kök hüceyrələri (MVXKH) ilk dəfə 2002-ci eksperimental yolla müəyyən edilmiş və bu hüceyrələrdə CD24, CD44, ESA kimi markerlərin yüksək ekspressiyası müşahidə olunmuşdur [4]. XKH normal kök hüceyrələr kimi, qeyri-aktiv vəziyyətdə olurlar və bu xüsusiyyət tətbiq olunan standart terapiyanın effektivsizliyindəki əsas səbəb kimi göstərilir. Belə ki, standart terapiya yalnız xərçəng hüceyrələrini məhv edir və XKH isə bu terapiyanın təsirinə məruz qalmayaraq, gələcəkdə yeni şiş hüceyrələrinə başlanğıc verirlər [5].

Xərçəng xəstəliyinin ən xarakterik xüsusiyyətlərindən biri də metastaz vermə qabiliyyətidir. Bu proses epitelial-mezenximal keçidin (EMK) hesabına baş verir. EMK nəinki, metastaz prosesində, həmçinin, yayılma və kimyəvi terapiyaya rezistentlik kimi proseslərdə aparıcı rol oynayır. EMK zamanı hüceyrələrin epitelial xüsusiyyətləri mezenximal xüsusiyyətlərə çevrilir. Belə ki, hüceyrələrin bir-birinə birləşməsi üçün vacib olan E-cadherin molekulunun ekspressiyasının azalması, mezenximal fenotip üçün xarakterik olan vimentin molekulunun ekspressiyasının artması müşahidə olunur. Bundan başqa, bu proses zamanı xərçəng hüceyrələrində

apoptoz prosesinə qarşı rezistentlik artır. 2008-ci ildə EMK 3 tipi müəyyən edilmişdir: 1-ci tip EMK embrioloji inkişafda, 2-ci tip EMK yara sağalmasında, toxumaların regenerasiyasında, orqanların fibrozunda, 3-cü tip EMK isə onkogenezdə müşahidə olunur. EMK nəticəsində hüceyrələr xərçəngində yarandığı ilkin orqandan digər orqanlara yayılma imkanı əldə edirlər [6-8]. Qeyd olunan, bu proseslər xərçəng kök hüceyrələri birbaşa əlaqəli proseslərdir. Ona görə də, EMK və xərçəng kök hüceyrələri arasındakı əlaqə daima maraq doğurmuşdur.

Tədqiqatın məqsədi. XKH xüsusiyyətləri və EMK prosesi arasında əlaqənin araşdırılması. Müxtəlif müalicə qruplarında XKH-nin miqrasiya etmək qabiliyyəti arasındakı fərqlərin araşdırılması.

Material və metodlar. Tədqiqat zamanı xərçəng kök hüceyrələri ilə zəngin mədəaltı vəzi xərçəngi (MVX) xətləri Mia-PaCa2 və PANC1 istifadə olunmuşdur. Hüceyrə xətləri Amerika Birləşmiş Ştatlarının ATCC şirkətindən əldə edilmişdir. Hər ay mikoplazma test olunmuş və eksperimentlərdə yalnız mikoplazma-neqativ hüceyrələr istifadə olunmuşdur.

*Koloniya*ların əmələ gəlməsi. Hüceyrələr 6-yuvacılıq plastik qablarda, hər yuvacıqda 300 hüceyrə olmaqla yerləşdirilmişdir. Hüceyrələr 7 gün ərzində kultivasiya olunmuşdur. Koloniyaların fiksasiyası üçün 3,7%-li paraformaldehid və 70%-li etanol məhlulu istifadə olunmuşdur. Növbəti mərhələdə 0,005%-li göy Coomassie məhlulu ilə rənglənmişdir.

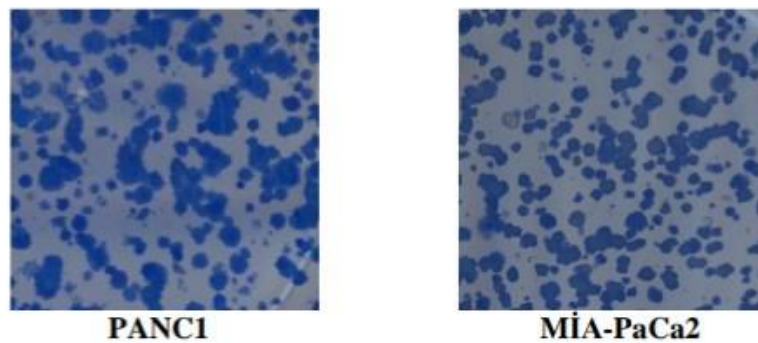
Mədəaltı vəzi hüceyrə xətlərinin müalicə olunması. Hüceyrə xətləri 1 ml-də 200.000 hüceyrə olmaq 12- yuvacılıq plastik qablarda yerləşdirilmişdir. 24 saatdan sonra 15 mikromol Gemcitabinlə və ya 450 mikromol 5-flüorurasil preparatı ilə müalicə olunmuşdur. İnterferon-alfa 3000 İU dozasında istifadə olunmuşdur.

RT-qPCR analizi. Eksperimentlərdə Rneasy mini Kit (Qiagen, Almaniya) və SYBR-Green PCR kit istifadə olunmuşdur. Eksperiment istehsalçı tərəfindən təqdim olunmuş protokola uyğun aparılıb.

Wound healing assay. Eksperiment üçün 20.000 hüceyrə 96-yuvacılıq plastik qablarda 24 saatlıq inkubatora yerləşdirilmişdir. 24 saatdan sonra yuvacıqlarda

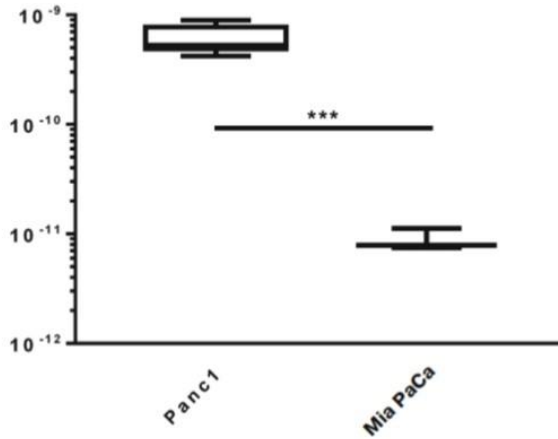
interferon-alfa ilə müalicə olunmuşdur. Daha 24 saat keçdikdən sonra hüceyrələr 72 saatlıq gempitabin preparatı ilə müalicə olunmuşlar.

Nəticələr və onun müzakirəsi. Ədəbiyyat materiallarında qeyd olunduğu kimi, xərçəng kök hüceyrələrinin (XKH) ən əsas xüsusiyyətləri özünü yeniləmə qabiliyyəti, yüksək DNT bərpa etmək qabiliyyəti, anti-apoptotik genlərin yüksək ekspressiyası, metastaz prosesinin tənzim edilməsi, kimyəvi dərman terapiyasına qarşı yüksək davamlılıq və EMK prosesinin aktiv getməsidir. Apardığımız tədqiqatda MVX hüceyrə xətlərindən olan PANC1 və MIA-PaCA2 seçilmişdir. İstehsalçı tərəfindən, həmçinin, aparılmış tədqiqatlar göstərmişdir ki, bu hüceyrə xətləri çox aqressivdirlər və ya başqa sözlə desək, xərçəng kök hüceyrələri ilə zəngindirilər. Bu hüceyrə xətlərində XKH markerlərinin (CD24, CD44, CD133, c-Met, CXCR4, ALDH, Sox2) yüksək ekspressiya olunması və kimyəvi terapiyaya qarşı yüksək rezistentlik öncə apardığımız tədqiqatlarda sübut olunmuşdur [9]. Məqalədə bəhs olunan tədqiqat işində əsas məqsəd MVX hüceyrələrinin əsas xüsusiyyətləri və EMK prosesi ilə mütənəsibliyi, həmçinin, təklif etdiyimiz müalicə rejiminin hüceyrələrin miqrasiya etmək qabiliyyətinə təsirini öyrənməkdən ibarət olmuşdur. Bu məqsədlə, öncə hüceyrələrin koloniya əmələ gətirmə qabiliyyəti yoxlanılmışdır. Bildiyimiz kimi, koloniya əmələ gətirmək XKH-in özünü yeniləmə qabiliyyəti kimi qiymətləndirilir. Alınan nəticələr göstərmişdir ki, MVX xətlərinin (PANC1 və MIA-PaCA2) koloniya əmələ gətirmə qabiliyyəti çox yüksəkdir (Şək. 1). Hüceyrələr artıq 7 gün ərzində iri koloniyalar əmələ gətirmişdir.



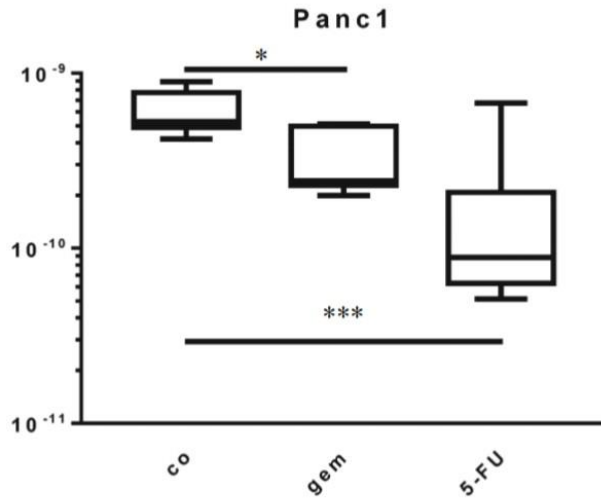
Şək. 1. Mədəaltı vəzi xərçəngi hüceyrə xətlərinin (Mia-PaCa2 və PANC-1) formalaşdırdığı koloniyalar.

Növbəti addım olaraq, bu hüceyrələrdə EMK prosesinin markeri olan E-cadherin ekspressiyası RT-qPCR analizi vasitəsilə araşdırılmışdır. Göründüyü kimi, hər iki hüceyrə xəttində E-cadherin ekspressiyası çox zəif olmuşdur və bu da, hər iki hüceyrə xəttinin epitelial-mezenximal tipə aid olduğunu göstərir (Şək. 2).



Şək. 2. RT-qPCR analizi ilə mədəaltı vəzi xərçəngi hüceyrə xətlərində (Mia-PaCa2 və PANC-1) E-cadherin ekspressiyası.

Qeyd etdiyimiz kimi, XKH-nin əsas xüsusiyyətlərindən biri də, kimyəvi terapiyaya qarşı davamlılıqdır. Tədqiqatda dünyada MVX-in standart terapiyası kimi qəbul olunan gemitabin və 5-flüorurasil preparatları istifadə olunmuşdur. Eksperimentin məqsədi standart terapiyadan sonra hüceyrələrin E-cadherin ekspressiyasının ölçülməsi olmuşdur. Göründüyü kimi, PANC1 hüceyrə xəttində hər iki müalicə qrupunda E-cadherin ekspressiyası azalmışdır (Şək. 3). Beləliklə, hüceyrələrdə EMK prosesinin baş verməsi müşahidə olunur. Həmçinin, hüceyrələrin standart terapiya qarşı davamlı olduğu fikrini irəli sürmək olar.

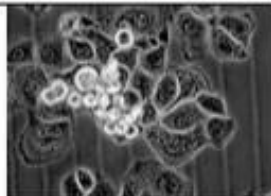
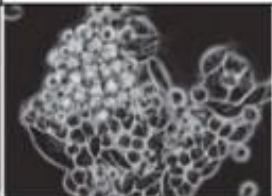


Şək. 3. RT-qPCR analizi ilə mədəaltı vəzi xərçəngi hüceyrə xəttində (PANC-1) Gemsitabin və 5-flüorurasil preparatları ilə müalicədən sonra E-cadherin ekspressiyası.

Yuxarıda qeyd olunanları ümümləşdirərək, tərəfimizdən cədvəl tərtib olunmuşdur (Cədvəl). Cədvəldən görüldüyü kimi, XKH xüsusiyyətləri olan yüksək koloniya əmələ gətirmə, kimyəvi terapiya qarşı davamlılıq və E-cadherin ekspressiyasının zəif olması, bununla da, EMK prosesinin müşahidə olunması, hər iki proses arasında qanunauyğunluğun olmasını göstərir. Belə ki, XKH ilə zəngin hüceyrə xətləri həm də, yüksək EMK prosesi həyata keçirirlər.

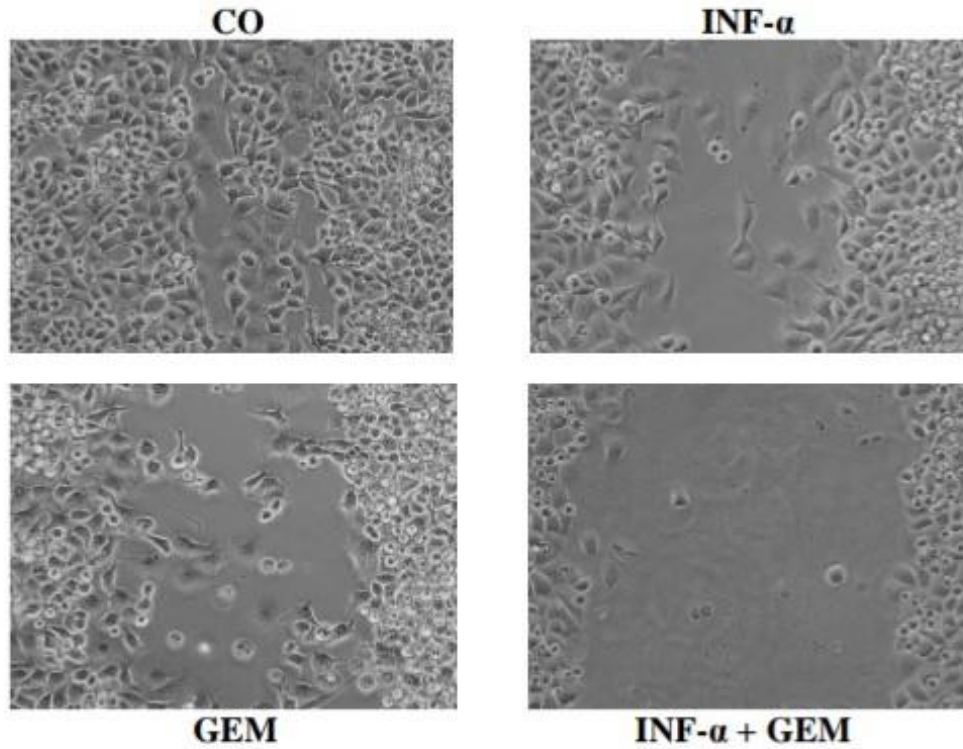
Cədvəl

Mədəaltı vəzi xərçəng kök hüceyrə xətlərinin (Mia-PaCa2 və PANC-1) xüsusiyyətləri

Xərçəng kök hüceyrəsi xüsusiyyətləri	MIA-PaCA2	PANC-1
Mənbə	İlkin şiş	İlkin şiş
Koloniya əmələ gətirmə	+++	+++
Gemsitabin rezistentliyi	+++	+++
E-Cadherin ekspressiyası	+	+
<i>In vitro</i> morfolojiya		

Qeyd: Yoxdur (-); Zəif (+); Orta (++); Yüksək (+++)

Son olaraq, MVX hüceyrə xətti PANC1 tərəfimizdən aparılan digər tədqiqatın tərkib hissəsi olaraq, İNF- α preparatı ilə ön müalicə olunaraq, daha sonra Gemsitebin preparatı ilə müalicə olunmuşdur. Qeyd etmək istərdik ki, tədqiqatın ideyası İNF- α preparatının XKH aktivləşdirməsi prinsipinə əsaslanmışdır. Bildiyimiz kimi, XKH standart terpaiyanın təsirinə məruz qalmamasının əsas səbəblərindən biri onların qeyri-aktiv vəziyyətdə olmasıdır. İNF- α XKH-ni aktivləşdirir və bununla da, standart terapiyada hədəf halına gətirilir. Bunun üçün, tədqiqatda 4 qrup istifadə olunmuşdur: kontrol, yalnız gemsitabin müalicəsi, yalnız İNF- α müalicəsi və İNF- α ilə gemistabindən ibarət kombinə olunmuş müalicə qrupu. Hüceyrələr öncə 24 saatlıq İNF- α preparatı ilə, daha sonra isə 72 saatlıq gemistabin preparatı ilə müalicə olunmuşlar. Nəticələr göstərir ki, kontrol qrupunda hüceyrələrin miqrasiya qabiliyyəti yüksək olmuşdur, çünki bu hüceyrələrdə EMK prosesi həyata keçirilir. Gemistabınla və İNF- α müalicə qruplarında analoji nəticələr müşahidə olunmuşdur. Bu, hüceyrələrin gemsitabin müalicəsinə davamlı olduğunu göstərir. İNF- α preparatının təkliklə XKH ilə mübarizədə effektiv olması barədə ədəbiyyatda heç bir məlumat qeyd olunmamışdır. Maraqlı nəticələr kombinə olunmuş qrupda müşahidə olunmuşdur. Göründüyü kimi, hüceyrələrin miqrasiya qabiliyyəti tamamilə dayanmış, həmçinin, hüceyrələrin sayında azalma müşahidə edilmişdir (Şək. 4). Bununla da, təklif olunan ideyanın elmi əhəmiyyətinin olması sübut olunmuşdur. İNF- α preparatının XKH-ni aktivləşdirdiyini və bununla da, gemsitabin preparatının effektivliyini yüksəltdiyi ideyası tərəfimizdən başqa eksperimentlər vasitəsilə araşdırılır.



Şək. 4. Wound healing assay vasitəsilə mədəaltı vəzi xərçəngi hüceyrə xəttində (PANC-1) müxtəlif müalicə qruplarında hüceyrələrin miqrasiya qabiliyyətinin ölçülməsi.

Yekun. Xərçəng kök hüceyrələri ilə zəngin mədəaltı vəzi xərçəngi hüceyrə xətləri MiA-PaCa2 və PANC1 ilə apardığımız tədqiqatlar göstərir ki, XKH xüsusiyyətləri və EMK prosesi arasında qanunauyğunluq vardır. Həmçinin, ədəbiyyatdan məlum olduğu kimi, EMK prosesi ilə kimyəvi terapiyaya qarşı davamlılıq problemi arasında birbaşa əlaqə vardır. Bununla da, gələcəkdə xərçəng xəstəliyi zamanı kimyəvi terapiyaya qarşı rezistentlik və metastaz vermə prosesində XKH və EMK prosesi hədəf nöqtə ola bilər. Həmçinin, apardığımız tədqiqatın nəticələri göstərmişdir ki, interferon preparatı XKH-ni aktivləşdirir və bununla da, hüceyrələri standart terapiyaya daha həssas hala gətirib çıxarır və hüceyrələrin miqrasiya etmə qabiliyyəti zəiflədir. Alınan nəticələr mədəaltı vəzi xərçənginin müalicəsi sahəsində əhəmiyyətli ola bilər.

ЛИТЕРАТУРА – ƏDƏBİYYAT – REFERENCES

1. Maisonneuve P. Epidemiology and burden of pancreatic cancer. Presse Med. (2019).

2. Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT. Pancreatic cancer // *Lancet*. 2020 Jun 27;395(10242):2008-2020.
3. Conroy T., Desseigne F., Ychou M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer // *N. Engl. J. Med.* 2011, 364-1825.
4. Li C., Heidt DG, Dalerba P. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res.* 2007, 67, 1030-1037.
5. Najafi M, Mortezaee K, Majidpoor J. Cancer stem cell (CSC) resistance drivers // *Life Sci.* 2019 Oct 1;234:116781.
6. Eva Rodriguez-Aznar, Lisa Wiesmueller, Bruno Sainz Jr. et. al. EMT and Stemness-Key players in pancreatic cancer stem cells // *Cancers* 2019, 11, 1136.
7. Pinting Zhou, Bo Li, Furao Liu et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer // *Molecular Cancer* (2017) 16:52.
8. Sanne Hindriksen, Maarten F. Bijlsma. Cancer stem cells, EMT and developmental pathway activation in pancreatic tumors // *Cancers* 2012, 4, 989-1035.
9. Orkhan Isayev, Vanessa Rausch, Nathalie Bauer et al., Inhibition of glucose turnover by 3-bromopyruvate counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to gemcitabine // *Oncotarget*. 2014 Jul 15;5(13):5177-89.

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN CANCER STEM CELLS AND THE PROCESS OF THE EPITHELIAL-MESENCHIMAL TRANSITION

Isayev O.R.

Azerbaijan Medical University, Department of Histology, Embryology and Cytology, Baku Azerbaijan;
Azerbaijan National Academy of Science, Institute of Genetic Resources, Baku Azerbaijan

Pancreatic cancer (PC) is the 4th leading cause of death due to cancer in the world. Worldwide, about 227,000 people die each year from PC. The reason for the aggressive course of this disease is late diagnosis, lack of specific markers, high relapse rate and high resistance to chemotherapy. In recent years, the theory that the cells responsible for processes such as chemotherapy and metastasis in cancer are cancer stem cells (CSC). According to this theory, CSCs make up about 1% of total tumor cells and have a high self-renewal ability, as well as the ability to initiate new tumor cells. One of the processes characteristic of cancer is the process of metastasis, and this process is based on the process of epithelial-mesenchymal transition. According to modern ideas, in the treatment of cancer, the target CSCs should be selected first. Thus, both the problem of resistance to chemotherapy and metastasis can be overcome.

Keywords: pancreatic cancer, epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells, markers.

PE3IOME

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ РАКА И ПРОЦЕССОМ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

Исаев О.Р.

Азербайджанский Медицинский Университет, кафедра гистологии, эмбриологии и цитологии, Баку, Азербайджан;
Национальная Академия Наук Азербайджана, Институт Генетических Ресурсов, Баку, Азербайджан

Рак поджелудочной железы (РПЖ) - 4-я ведущая причина смерти от рака в мире. Ежегодно во всем мире от РПЖ умирает около 227000 человек. Причина агрессивного течения этого заболевания - поздняя диагностика, отсутствие специфических маркеров, высокая частота рецидивов и высокая устойчивость к химиотерапии. В последние годы появилась теория, согласно которой клетки, ответственные за такие процессы, как устойчивость к химиотерапии и метастазирование при раке, являются раковыми стволовыми клетками. Согласно этой теории, раковые стволовые клетки составляют около 1% от общего количества опухолевых клеток и обладают высокой способностью к самообновлению, а также инициированию новых опухолевых клеток. Одним из процессов, характерных для рака, является процесс метастазирования, в основе которого лежит процесс эпителиально-мезенхимального перехода. Согласно современным представлениям, при лечении рака, в первую очередь, следует выбирать стволовые клетки-мишени. Таким образом, можно преодолеть как проблему устойчивости к химиотерапии, так и метастазирования.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, раковые стволовые клетки, маркеры.

Redaksiyaya daxil olub: 05.08.2020

Çapa tövsiyə olunub: 03.09.2020

Rəyçi: professor E.K.Qasimov