

## أثر مشتقات البلاطين على حيوية الخطين الخلويين MDA-MB-231 و MCF7 المشتقين من سرطان الثدي ودور نواقل ABC والخلايا الجذعية السرطانية في المقاومة

د. شادي سكرية\*

د. حسام مراد\*\*

يمان الغميان\*\*\*

(تاريخ الإيداع 10 / 09 / 2020. قُبل للنشر في 3 / 11 / 2020)

### □ ملخص □

تعد سرطانات الثدي السبب الرئيسي للوفاة لدى النساء وتتصف بكونها غير المتجانسة على المستوى الجزيئي وفي قابلية استجابتها للعلاج الكيميائي. تؤدي مقاومة السرطانات للعلاج الكيميائي إلى فشل العلاج وارتفاع معدل الوفيات. وترتبط الأدلة الحديثة اكتساب المقاومة للعلاج الكيميائي بكلٍ من التعبير عن الجينات المرمزة لنواقل الدواء ABCs ووجود الخلايا الجذعية السرطانية. لذا كان هدف هذا البحث دراسة استجابة الخطين الخلويين MDA-MB-231 و MCF7 المشتقين من سرطان الثدي للسيسلاتين والكاربوبلاتين وتحديد دور الآليتين السابقتين في المقاومة على المستوى الجزيئي. تم إجراء البحث في مخبر الخلايا السرطانية البشرية هيئة الطاقة الذرية من بداية عام 2018 وحتى نهاية شهر 7 من عام 2020. تمت التجارب على الخطوط الخلوية السرطانية MCF7 و MDA-MB-231 المشتقة من سرطان الثدي، والتي تم شراؤها من بنك الخلايا السرطانية الأوروبي. حددت الحيوية الخلوية للخطين المدروسين بعد المعالجة بتركيز متزايدة من السيسلاتين والكاربوبلاتين بطريقة الXTT، درس التعبير عن الجينات المرمزة لنواقل الدواء ABCB1 و ABCC1 و ABCC2 و ABCC3، والتعبير عن واسمات الخلايا السرطانية الجذعية الخاصة بسرطان الثدي CD44 و CD24 و ALDH1 بتقانة Real time PCR. بينت نتائجنا أن المعالجة بالسيسلاتين والكاربوبلاتين تخفض الحيوية الخلوية، وأن السيسلاتين أكثر فعالية من الكاربوبلاتين، وأن الخط الخلوي MDA-MB-231 أكثر مقاومة للسيسلاتين بالمقارنة مع الخط MCF7. كما أظهرت النتائج انخفاض تعبير الجينات ABCB1 و ABCC1 و ABCC2 و ABCC3، 0.05 و 0.02 و 0.3 و 0.05 مرة، على الترتيب في الخلايا MDA-MB-231، وامتلاك الخلايا MDA-MB-231 تعبيراً مرتفعاً لواسم الخلايا السرطانية الجذعية ALDH1 (46.9 ضعف) وذلك بالمقارنة مع الخلايا MCF7. الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، السيسلاتين، الكاربوبلاتين، المقاومة الخلوية للعلاج الكيميائي، نواقل ABC، الخلايا السرطانية الجذعية.

\* أستاذ - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

\*\* أستاذ - قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية.

\*\*\* طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

البريد الإلكتروني: [Yamanghamian1@gmail.com](mailto:Yamanghamian1@gmail.com)

## The Effect of Platinum Derivatives on MDA-MB-231 and MCF7 Breast Cancer Cell Lines Viability and the Role of the ABCs and CSCs in Chemoresistance

Dr. Chadi Soukkarieh\*  
Dr. Hossam Murad\*\*  
Yaman Alghamian\*\*\*

(Received 10 / 9 / 2020. Accepted 3 / 11 / 2020)

### □ ABSTRACT □

Breast cancers are the leading cause of death in women worldwide. Breast cancers are heterogeneous at the molecular level and in their response to chemotherapy. Chemoresistant is an essential reason for treatment failure and the high mortality. Emerging evidence associate ABCs expression, cancer stem cells and acquisition of chemoresistance in cancer. Here we investigate the response of MDA-MB-231 and MCF7 cell lines to cisplatin and carboplatin and we determine the role of the previous mechanisms in resistance at the molecular level. This research was conducted in the human cancer cells laboratory of the Atomic Energy Commission from the beginning of 2018 to 7th of 2020. MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were purchased from the British Cancer Cell Bank.

MDA-MB-231 and MCF7 cells were treated with increased concentrations of cisplatin and carboplatin. Cell viability was determined by XTT. Gene expression of the most important members of the ABC family; ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCC3 and the breast cancer stem cells markers *CD44*, *CD24*, *ALDH1* were studied with Real time PCR.

Our results indicated that cisplatin and carboplatin treatments reduced the cell viability for both studied lines. MDA-MB-231 line was more resistant to cisplatin and carboplatin. MDA-MB-231 cisplatin resistant fold increased 6 times compared to MCF7 line. Our results showed that cisplatin reduced MDA-MB-231 and MCF7 viability more than treatment with carboplatin. The expression of *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, and *ABCC3* genes, decreased 0.05, 0.02, 0.3, and 0.05 times, respectively in MDA-MB-231 cells compared to MCF7 cells. MDA-MB-231 cells also had a high expression of the stem cells marker *ALDH1* (46.9 times) compared to MCF7 cells.

**Keywords:** Breast cancer, cisplatin, carboplatin, chemoresistant, ABC, cancer stem cells.

\* Professor - Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria.

\*\* Professor - Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS).

\*\*\* Postgraduate Student (PhD) - Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria. E-mail: [Yamanghamian1@gmail.com](mailto:Yamanghamian1@gmail.com)

## مقدمة:

تعد الأدوية المشتقة من البلاطين أدوية مضادة للسرطان تستخدم سريراً على نطاق واسع سواء كان الاستخدام بشكل مفرد أو بالمشاركة مع أدوية أخرى، إذ يقدر استخدام أدوية البلاطين في 50٪ من جميع الأنظمة السريرية [1]. تعد نظائر البلاطين، السيبلاتين والكاربوبلاتين من أكثر العلاجات الكيميائية المستخدمة في علاج الأورام، مثل أورام الخصية والمبيض وعنق الرحم والرئة والرأس والعنق والمريء وسرطان المثانة وأورام الخلايا المنشئة وسرطان الثدي [2]. ويعد سرطان الثدي من أكثر سرطانات النساء التي يتم تشخيصها في البلدان المتقدمة والنامية. وتشير تقديرات منظمة الصحة إلى وجود أكثر من 2.09 مليون حالة في جميع أنحاء العالم. كما يعد سرطان الثدي السبب الرئيس لوفيات السرطان بين النساء في جميع أنحاء العالم [3]. وتملك خلايا سرطان الثدي أشكالاً مختلفة مورفولوجياً وخصائص جزيئية مختلفة ولها استجابات متباينة للعلاج [4]. ويعالج سرطان الثدي بشكل رئيسي بعلاجات سامة للخلايا مثل (باكليتاكسل، ودوكسوروبيسين، وفلورويوراسيل، ومشتقات البلاطين)، أو بعلاجات هرمونية أو بعلاجات مستهدفة، تقوم مجمل هذه العلاجات بخفض معدل الوفيات وإطالة زمن البقاء [5]. وتستخدم الأدوية المشتقة من البلاطين في العلاج الكيميائي المساعد لتقليل الوفيات الناجمة عن سرطان الثدي [6]. ويقوم مركب السيبلاتين والكاربوبلاتين بالتأثير داخل الخلية من خلال تشكيل معقدات بلاطينية ترتبط بالحمض النووي، محدثةً أضراراً على جزيئة DNA ومفعلةً آليات إصلاح الحمض النووي DNA repair. وعندما تقشَل آليات الإصلاح في عملها تموت الخلية بعد تفعيل سبيل الموت الخلوي المبرمج apoptosis. تعد المقاومة الخلوية للعوامل المضادة للسرطان بما في ذلك مركبات cisplatin، و docetaxel، و paclitaxel، و doxorubicin أحد محددات العلاج الكيميائي الفعال في سرطان الثدي [7، 8]. توصف الأورام غير المستجيبة للأدوية الكيميائية بأنها مقاومة للعلاج الكيميائي، وتعود هذه الصفة لاحتوائها على خلايا سرطانية مقاومة تعرف باسم الخلايا السرطانية المقاومة للعديد من الأدوية (MDR) multidrug resistance والتي تعد من الأسباب الرئيسية لفشل العلاج الكيميائي للسرطان [9-11]. إن الفهم الدقيق للآليات الجزيئية الكامنة وراء مقاومة العلاج الدوائي قد يسهم في تحسين معدلات البقاء وتحسن من نوعية حياة المرضى.

بينت الدراسات وجود العديد من الآليات التي تطور من خلالها الخلايا السرطانية المقاومة للعوامل السامة للخلايا والتي تتضمن تغيرات في العديد من السبل الحيوية مثل: خفض تحويل الدواء إلى شكل نشط [12]، وتعزيز إصلاح الأضرار الناجمة عن المعالجة بالأدوية [13، 14]، وتغير تعبير الجينات المنظمة للموت الخلوي المبرمج أو المنظمة لسبل الحفاظ على الحيوية [15]، والتحول الخلوي للخلايا من الشكل الظهاري إلى الشكل الميزانشيمي-Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) [16-18]. كما يعد خفض مستويات الدواء داخل الخلايا من خلال زيادة إخراج الدواء بنواقل الأدوية ABC transporters (ATP binding cassette) والتي تسمى أيضاً بمضخات التدفق efflux pumps إحدى الآليات الرئيسية لـ MDR [19، 20]. ميزت الدراسات 48 فرداً من هذه النواقل تم تصنيفها حسب تجانس تسلسلاتها المرمزة وحسب عدد المجالات الغشائية إلى 7 عائلات، ويشارك منها 16 فرداً من أفراد هذه العائلات في الأمراض البشرية. تملك كل من ABCB1 و ABCC1 و ABCG2 أهمية كبيرة في الأنسجة السليمة، كونها تحمي الجسم من مجموعة متنوعة من المركبات داخلية وخارجية المنشأ السامة وذلك لأنها تقوم بإخراج هذه العوامل السامة عبر أغشية الخلايا، حتى بعكس مدروجيات شديدة التركيز [21]. بينت العديد من الدراسات أن هذه العوامل السامة عبر أغشية الخلايا، التي تعد النواقل الرئيسية للأدوية تتدخل في ABCB1 (p-glycoprotein / MDR1) و ABCC1 (MRP1) والتي تعد النواقل الرئيسية للأدوية تتدخل في

مقاومة الأدوية في العديد من السرطانات. وتم رصد التعبير المفرط لهذه الناقلات في العديد من السرطانات بما في ذلك سرطانات الرئة والثدي والبنكرياس، وتم الربط بين ارتفاع تعبير هذه الناقلات عكسياً مع زمن البقاء [22]. كما ربطت العديد من الدراسات بين المقاومة للأدوية وبين التعبير عن الجينات المرتبطة بالخلايا السرطانية الجذعية وذلك في عدة أنواع من السرطانات كسرطان الكبد [23] والمبيض [24] والكولون [25] وسرطان الرئة [26] وسرطان الثدي [27]. وتمتاز الخلايا السرطانية الجذعية في سرطان الثدي بالتعبير عن الواسمات الجذعية مثل CD44+/CD24- وALDH1 [28]. ويرتبط وجود الصفة الجذعية في الأورام بالعدائية وتشكيل النقائل والمقاومة للعلاجات المختلفة [29, 30].

### أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من أن سرطانات الثدي منتشرة وشائعة وهي السبب الرئيسي للوفاة لدى النساء، وتتصف سرطانات الثدي بتغايرها على المستوى الجزيئي وبقابلية استجابتها للعلاج الكيميائي. ولكون مقاومة السرطانات -ومن بينها سرطان الثدي- للعلاج الكيميائي هي السبب الرئيس لفشل العلاج وارتفاع معدل الوفيات، ولوجود صلة بين كل من المقاومة للأدوية المضادة للسرطان والتعبير الزائد عن ناقل الدواء إلى خارج الخلية والخلايا السرطانية الجذعية، هدفت هذه الدراسة إلى تحري أثر المعالجة بالسيسبلاتين والكاربوبلاتين على حيوية خطين خلويين مشتقين من سرطان الثدي وهما MDA-MB-231 وMCF7 والكشف عن العلاقة المحتملة بين اكتساب الخلايا المقاومة للسيسبلاتين والكاربوبلاتين (مشتقات البلاتين) وتعبيرها المرتفع عن أهم جينات ABCs وحملها لبعض صفات الخلايا السرطانية الجذعية.

### زمن ومكان وعينة الدراسة:

تم إجراء البحث في مخبر الخلايا السرطانية البشرية في قسم التقانة والبيولوجيا الجزيئية في هيئة الطاقة الذرية. بدء البحث من بداية العام 2018 وحتى نهاية شهر 7 من عام 2020. تم إجراء التجارب على الخطوط الخلوية السرطانية MCF7 وMDA-MB-231 المشتقة من سرطان الثدي، والتي تم شراؤها من بنك الخلايا السرطانية الأوروبي ECACC-European Collection of Authenticated Cell Cultures عن طريق شركة (Sigma, USA).

### طرائق البحث ومواده:

#### أولاً: الزراعة الخلوية:

زُرِعَ الخطان الخلويان المشتقان من سرطان الثدي MCF7 وMDA-MB-231 (Sigma, USA) ضمن فلاسكات زراعة خلوية في وسط (Sigma, USA) RPMI-1640 حاوٍ على 10% مصّل البقر الجنيني (Sigma, USA)، و(FBS, fetal bovine serum) و2mM غلوتامين (Gibco, USA)، بوجود الصادين الحيويين البنسيلين والستربتوميسين بتركيز 1% (Gibco, USA)، عند درجة الحرارة 37°C وجو نصف رطب مزود بغاز CO<sub>2</sub> بتركيز 5% في حاضنة CO<sub>2</sub> (Binder, Germany).

#### ثانياً: رسم المنحني العياري لنمو الخلايا السرطانية:

تم رسم المنحني العياري لنمو الخلايا السرطانية الخاص بكل خط خلوي، وذلك بهدف معرفة عدد الخلايا الأمثل من أجل تطبيق المعالجة الدوائية وقياس الحيوية الخلوية بطريقة المقايسة اللونية XTT. حيث زُرعت الخلايا في أطباق

زراعة خلوية ذات الـ 96 بئراً بتركيز متدرج من  $10^3 - 8 \times 10^3$  خلية/بئر، ووضعت في الحاضنة. في اليوم التالي تم إضافة محلول الـ XTT (Roche, Germany) حسب تعليمات الشركة المصنعة. قُرأت الامتصاصية بطول موجة 450nm باستخدام قارئ الصفائح (Multiskan Ascent absorbance plate reader, ThermoLabsystems, Germany). وتم تمثيل قيم الامتصاصية على المحور العمودي (Y) وما يقابلها من عدد خلوي على المحور الأفقي (X) لرسم المنحني المعياري.

#### ثالثاً: دراسة الحيوية الخلوية بعد المعالجة بالسيسبلاتين والكاربوبلاتين:

زرعت الخلايا في أطباق زراعة خلوية ذات الـ 96 بئراً ( $10^4$  خلية/بئر) لمدة 24 ساعة ثم تمت معالجتها بمركب السيسبلاتين أو بمركب الكاربوبلاتين (Sigma, USA) بالتركيز 10، 30، 50 µg/ml. تمت إضافة محلول الـ XTT (Roche, Germany) حسب تعليمات الشركة المصنعة، وقُرأت الامتصاصية للخلايا الشاهدة والخلايا المعالجة بعد 24 ساعة من المعالجة، تم إسقاط قيم الامتصاصية على المنحني العياري التابع لكل خط لمعرفة العدد الخلوي وحُسبت قيم الحيوية الخلوية بنسبها لقيم الخلايا الشاهدة والتي تعطى قيمة حيوية 100%.

#### خامساً: دراسة التعبير الجيني بتقانة التضخيم بالزمن الحقيقي Real Time PCR لأهم جينات ABC و الجينات المرمزة لبروتينات واسمة للخلايا السرطانية الجذعية في سرطان الثدي:

عزل RNA الكلي من الخطين الخلويين MCF7 و MDA-MB-231 باستخدام طاقم العزل RNeasy Mini kit (Qiagen, Germany). تم تحويل 3µg من RNA إلى cDNA باستخدام أنزيم النسخ العكسي M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) حسب تعليمات الشركة المصنعة. وتم التضخيم بالزمن الحقيقي Real Time PCR لـ 40 دورة باستخدام الجهاز StepOne (Applied Biosystems, USA) باستخدام كيت Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo, USA). حسب التغير النسبي في التعبير الجيني بطريقة  $\Delta\Delta^{Ct}$  باستخدام الجين *GAPDH* كجين مرجعية، وذلك للجينات المسؤولة عن خفض مستويات الدواء داخل الخلايا من خلال زيادة إخراج الدواء بناقلات ABC وهي *ABCB1* و *ABCC1* و *ABCC2* و *ABCC3* وللجينات المرمزة لبروتينات واسمة للخلايا السرطانية الجذعية في سرطان الثدي وهي *CD44* و *CD24* و *ALDH1*، وتم إجراء التفاعلات بثلاثة مكررات. ويوضح الجدول 1 تسلسلات البادئات المستخدمة في تفاعل Real Time PCR.

الجدول (1): تسلسلات البادئات المستخدمة في تفاعل التضخيم بالزمن الحقيقي في هذه الدراسة.

رمز الجين	تسلسل البادئات (5'-3')
<i>ABCB1</i>	F- GAGGGGATGGTCAGTGTTGATGG
	R- ATCGTGGTGGCAAACAATACAGGT
<i>ABCC1</i>	F-CTCCTGTGGCTGAATCTGGG
	R- AGCACTTTGATCCCATTGAGAATTTTCG
<i>ABCC2</i>	F- CCTGGGAACATGATTCGGAAGCC
	R- GGAGGATTTCCAGAGCCGAC
<i>ABCC3</i>	F- GGCTCCTTTGCCAACTTTCTCTGC
	R- CAGGGCACTCAGCTGTCTCATAAAC
<i>CD44</i>	F- GCTGAGCCTGGCGCAGATC
	R- TCTCCATCTGGGCCATTGTGGG
<i>CD24</i>	F-TGCTCCTACCCACGCAGATTTATTC
	R-GGGCCAACCCAGAGTTGGAAGT
<i>ALDH1</i>	F-CTGTGCAGGTTGGGCTGACAAG
	R-GCAGGCCCTATCTTCCAAATGAGC
<i>GAPDH</i>	F- ATGACCCCTTCATTGACC
	R- GAAGATGGTGATGGGATTTTC

### سابعاً: الدراسة الإحصائية:

استخدم البرنامج 7 GraphPad Prism (USA) في الدراسة الإحصائية، إذ حلت الفروقات بين المجموعات التجريبية باستخدام اختبار Student-t test، واعتبرت الفروقات معنوية عندما تكون قيمة  $P < 0.05$ .

### النتائج والمناقشة:

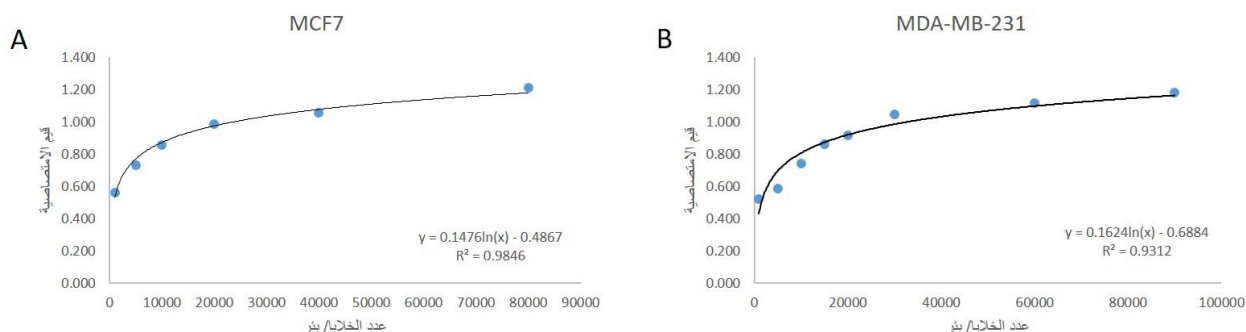
#### أولاً: رسم المنحنيات المعيارية للخطين الخلويين MCF7 وMDA-MB-231:

رسمت المنحنيات المعيارية التابعة للخطين الخلويين MCF7 (الشكل 1A)، وMDA-MB-231 (الشكل 1B) باستخدام طريقة XTT، حيث تم تمثيل قيم الامتصاصية بطول موجة 450nm وما يقابلها من عدد خلوي على منحنى معياري، تم استنباط معادلة المنحنيات والتي من الممكن استخلاص العدد الخلوي منها بعد تعويض قيم الامتصاصية فيها، وكانت المعادلات كالتالي:

$$y = 0.1476 \ln(x) - 0.4867 \text{ MCF7}$$

$$y = 0.1624 \ln(x) - 0.6884 \text{ MDA-MB-231}$$

وكانت قيمة الـ  $R^2$  (coefficient of determination) تساوي 0.9846، و0.9812 لـ MCF7 وMDA-MB-231 على الترتيب (الشكل 1). وبالتالي حدد عدد الخلايا الأمثل للزراعة ضمن المجال  $5 \times 10^3$  -  $20 \times 10^3$  خلية/بئر للخط الخلوي MCF7 و  $5 \times 10^3$  -  $30 \times 10^3$  خلية/بئر للخط الخلوي MDA-MB-231. وتعد طريقة XTT طريقة كمية لونية شائعة تستخدم في قياس الحيوية الخلوية وفي دراسة السمية الخلوية وذلك في الخلايا حقيقية النواة [31].



الشكل (1): المنحنيات المعيارية للخطوط الخلوية المدروسة بطريقة XTT.

A. المنحني المعياري للخط الخلوي MCF7

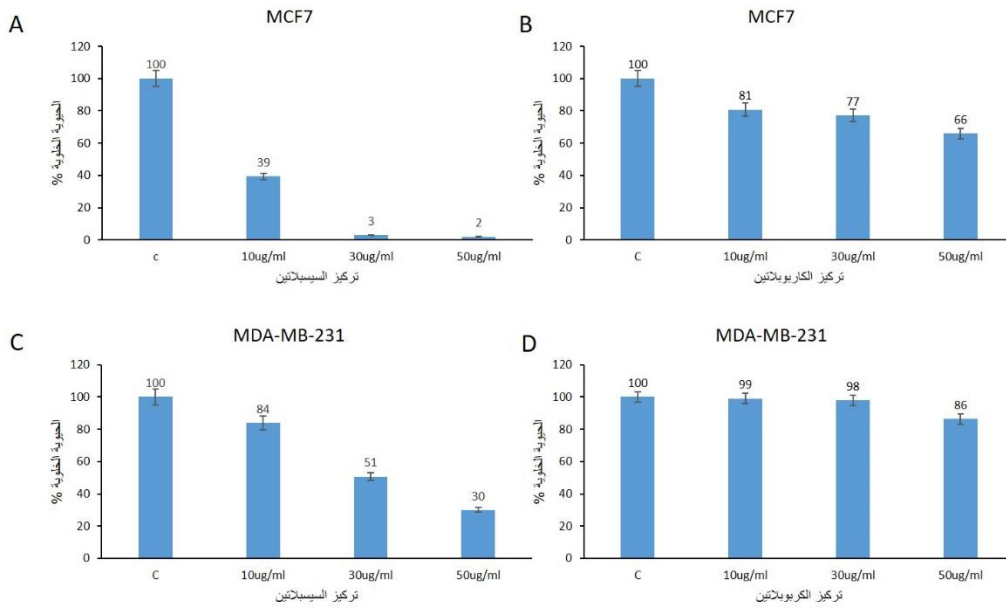
B. المنحني المعياري للخط الخلوي MDA-MB-231

#### ثانياً: أثر المعالجة بالسيسبلائين والكاربوبلاتين على الحيوية الخلوية:

أظهرت نتائج حيوية الخلايا MCF7 المعالجة لمدة 24 ساعة بتركيز متزايدة من مركب السيسبلائين 10، 30، 50  $\mu\text{g/ml}$  انخفاضاً متزايداً في حيويتها مع زيادة التركيز 39، 3، 2 % (الشكل رقم 2A)، كما أدت المعالجة بالكاربوبلاتين وبالتراكيز ذاتها 10، 30، 50  $\mu\text{g/ml}$  إلى خفض حيوية الخلايا MCF7 بشكل متزايد مع التركيز إلى

81، 77، 66 % على الترتيب. تبين نتائج هذه التجربة اختلافاً كبيراً في أثر المركبين على حيوية الخلايا، إذ كان الأثر الأكبر لمركب السيسبلاتين (الشكل رقم 2B).

كما أظهرت نتائج حيوية الخلايا MDA-MB-231 المعالجة لمدة 24 ساعة بتركيز متزايدة من مركب السيسبلاتين 10، 30، 50  $\mu\text{g/ml}$  انخفاضاً متزايداً في حيويتها إلى 84، 51، 30 % على الترتيب (الشكل رقم 2C)، كما أدت المعالجة بالكاربوبلاتين بالتركيز 10، 30، 50  $\mu\text{g/ml}$  إلى خفض حيوية الخلايا بشكل طفيف MDA-MB-231 إلى 99، 98، 86 % على الترتيب (الشكل رقم 2D).



الشكل (2): أثر التراكيز المتزايدة من السيسبلاتين والكاربوبلاتين على الحيوية الخلوية للخطين الخلويين MCF7 و MDA-MB-231 بالاعتماد على طريقة XTT.

يوضح الشكل انخفاضاً متزايداً بالحيوية الخلوية بعد المعالجة لمدة 24 ساعة بتركيز متزايدة من مركبي السيسبلاتين والكاربوبلاتين، يلاحظ انخفاض الحيوية بشكل كبير في الخط الخلوي (A, B) MCF7 بالمقارنة مع الخط الأكثر مقاومة للعلاج (B, C) MDA-MB-231. كما يلاحظ أن المعالجة بالسيسبلاتين أدت إلى خفض الحيوية بشكل أكبر بالمقارنة مع المعالجة بالكاربوبلاتين في كلا الخطين المدروسين. تم اعتبار حيوية الخلايا الشاهدة 100% ومن ثم تمت مقارنة نتائج الحيوية لجميع المجموعات التجريبية مع حيوية الخلايا الشاهدة. تم التعبير عن النتائج بقيم المتوسطات  $\pm$  قيم الانحراف المعياري.

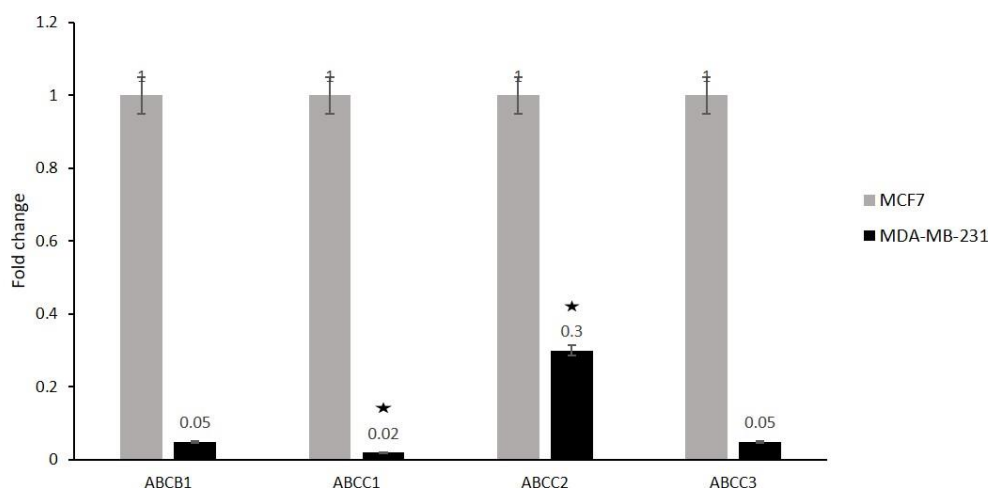
بالاعتماد على هذه النتائج، نلاحظ أن المعالجة بالسيسبلاتين والكاربوبلاتين تؤدي إلى خفض الحيوية الخلوية في الخطين المدروسين. بينت الدراسات أن الأثر التي تسببه مشتقات البلايتين يأتي من ارتباط هذه المركبات بالحمض النووي لتشكيل معقدات بلايتين-حمض نووي مما يسبب أضراراً للحمض النووي. وبعد حدوث تلف في الحمض النووي، يتم تنشيط نقاط فحص الدارة الخلوية إما لإصلاح الحمض النووي التالف أو لتحفيز الموت الخلوي المبرمج [32، 33]. وقد أظهرت عدة أبحاث أن استخدام السيسبلاتين والكاربوبلاتين كعلاجات أحادية أو ضمن توليفات مع علاجات كيميائية أخرى يؤمن طريقة فعالة في معالجة سرطان الثدي النقائلي ويسبب خفض حيوية الخلايا السرطانية

[34, 35]. بينت نتائجنا أن العلاج بمركب السيسبلاتين أدى إلى خفض الحيوية بشكل أكبر بكثير من العلاج بمركب الكاربوبلاتين في الخططين MCF7 وMDA-MB-231. وعلى الرغم من أن آلية عمل المركبين السيسبلاتين والكاربوبلاتين متشابهة إلا أن عدة دراسات -وبشكل مشابه لنتائجنا- بينت وجود اختلاف في فعالية المركبين في القضاء على الخلايا السرطانية [36]. وبشكل عام يحتاج الكاربوبلاتين إلى جرعة أعلى من 4 إلى 8 مرات من السيسبلاتين لإظهار نفس السمية الخلوية وتختلف هذه الفعالية بالاعتماد على نوع السرطان [37].

أوضحت نتائجنا أن الخلايا MDA-MB-231 كانت أقل استجابة لمركبي السيسبلاتين والكاربوبلاتين بالمقارنة مع الخلايا MCF7 حيث كان الانخفاض في الحيوية قليلاً بالمقارنة مع انخفاض حيوية الخلايا MCF7 بعد المعالجة بنفس الجرعة، أي أن خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 أكثر مقاومة للعلاج بمركبات البلاتين من خلايا الخط الخلوي MCF7. تمت ملاحظة الفارق في الاستجابة بين الخططين لمركب 5 فلوروراسيل في دراسة Zhang وزملائه حيث كانت قيم  $IC_{50}$  للخط MDA-MB-231 أكبر بشكل معنوي من الخط MCF7 [38]. كما بين Tassone وزملائه الفارق في الاستجابة للمعالجة للسيسبلاتين بين الخططين MDA-MB-231 وMCF7. وفي دراسة ربطت بين المقاومة وحالة الجين *BRCA1* كان للخط MDA-MB-231 قيم  $IC_{50}$  أكبر من قيم  $IC_{50}$  للخط MCF7 بثلاثة مرات [39].

**ثالثاً: تعبير الجينات المرمزة لبروتينات ناقلة الدواء لا يرتبط بالمقاومة لمشتقات البلاتين في الخط الخلوي MDA-MB-231**

بهدف اختبار إن كان التعبير عن الجينات المرمزة لبروتينات إخراج الدواء هو أحد أسباب المقاومة لمركبات البلاتين تمت دراسة التعبير الجيني بتقانة Real Time PCR للجينات *ABCs* الناقلة للدواء إلى خارج الخلية في الخلايا المقاومة لمركبات البلاتين MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخلايا الحساسة MCF7. يُظهر الشكل 3 انخفاض التعبير الجيني عن الجينات *ABCB1* و *ABCC1* و *ABCC2* و *ABCC3* بمقدار 0.05، 0.02، 0.3، و 0.05، على الترتيب في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 المقاومة لمركبات البلاتين بالمقارنة مع خلايا الخط الخلوي MCF7.



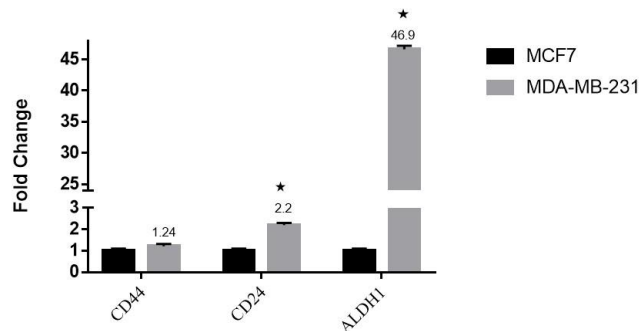
الشكل (3): انخفاض التعبير عن الجينات *ABCB1* و *ABCC1* و *ABCC2* و *ABCC3* المرمزة للبروتينات المسؤولة عن إخراج الدواء إلى خارج الخلية في الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخط الأكثر حساسية للسيسبلاتين والكاربوبلاتين MCF7.



تم نسب التعبير الجيني للجين المرجعية *GAPDH* وإعطاء التعبير الجيني في الخط MCF7 القيمة 1. تم التعبير عن النتائج بقيم المتوسطات  $\pm$  قيم الانحراف المعياري،  $P < 0.05$ .\*

إن انخفاض التعبير الجيني للجينات *ABCC1* و *ABCC2* و *ABCC3* و *ABCB1* في الخط المقاوم MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخط MCF7 الأكثر حساسية لمشتقات البلاطين، يوضح أن تعبير الجينات المرمزة لبروتينات ناقلة للدواء لا يرتبط بالمقاومة لمشتقات البلاطين في الخط الخلوي MDA-MB-231. وبشكل مشابه لنتائج بحثنا، بينت دراسة على عدة أورام وخطوط خلوية مشتقة من سرطان الثدي ومن بينها الخطين MCF7 و MDA-MB-231 أن التعبير عن الجين *ABCC1* مرتفعاً في الأورام والخطوط السرطانية مقارنة مع الخلايا الطبيعية، وأن للخط MCF7 تعبيراً مرتفعاً عن الجين *ABCC1* مقارنة مع الخط MDA-MB-231 [40]. وفي دراسة أخرى تم فيها التحري عن تعبير أفراد عائلة ABC في 60 خطأً خلويًا سرطانيًا مختلف المنشأ، تبين أن التعبير عن أفراد هذه العائلة غير متجانس في الخطوط الخلوية المشتقة من سرطان الثدي ولا يرتبط بالمقاومة للعلاجات الكيميائية مثل 5 فلورويوراسيل [41]. فمثلاً كان التعبير عن *ABCB1* و *ABCC2* أعلى في الخط الخلوي MCF7 بالمقارنة مع خلايا الخط MDA-MB-231 وذلك بشكل مشابه لما ظهر في دراستنا، أما التعبير عن *ABCC1* و *ABCC3* كان أقل في الخط الخلوي MCF7 بالمقارنة مع خلايا الخط MDA-MB-231. وبشكل معاكس وجدت دراسة أن زيادة التعبير عن *ABCB1* يترافق مع اكتساب المقاومة للعلاجات الكيميائية كالإبيروبيسين أو الباكليتاكسيل، هذه الزيادة في التعبير تترافق مع انخفاض في متيلة محض الجين *ABCB1* [42].

رابعاً: الربط بين المقاومة لمركبات البلاطين وزيادة التعبير عن *ALDH1* واسم الخلايا السرطانية الجذعية الثديية: من أجل اختبار إن كانت المقاومة لمركبات البلاطين في الخلايا MDA-MB-231 ترتبط بالتعبير الجيني للجينات المرتبطة بالخلايا السرطانية الجذعية، قمنا بقياس التعبير الجيني بطريقة Real time PCR لأهم هذه الجينات المعبر عنها عادة في الخلايا السرطانية الجذعية لسرطان الثدي Breast Cancer Stem Cells –BCSCs، إذ تتميز هذه الخلايا إما بالتعبير عن  $CD44^+/CD24^-$  أو بالتعبير عن الواسم  $ALDH^+$  بشكل مرتفع. وكما يظهر من الشكل 4، يزداد التعبير عن الجينتين *CD24* و *ALDH1* في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231، بالمقارنة مع الخلايا MCF7 الأكثر حساسية للسيسبلاتين والكاربوبلاتين، بمقدار 2.2 و 46.9 ضعفاً، على الترتيب، بينما لم يتغير التعبير بشكل معنوي عن الجين *CD44* (1.24)، لذا من الممكن أن نفترض أن خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 أكثر خباثة وتملك بعضاً من صفات الخلايا السرطانية الجذعية.



الشكل (4): مقارنة التعبير عن الجينات *CD24* و *ALDH1* المرمزة لبروتينات تميز الخلايا السرطانية الجذعية السرطانية بين الخطين الخلويين MCF7 و MDA-MB-231 بطريقة Real time PCR.

تظهر النتائج زيادة التعبير عن *CD24* و *ALDH1* في خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 بمقدار 2.2 و 46.9 ضعفاً على الترتيب بالمقارنة مع الخط الأكثر حساسية لمشتقات البلاتين MCF7. تم نسب التعبير لجين مرجعية *GAPDH* وإعطاء التعبير الجيني في الخط MCF7 القيمة 1. تم التعبير عن النتائج بقيم المتوسطات  $\pm$  قيم الانحراف المعياري،  $*P < 0.05$ .

ربطت العديد من الدراسات بين وجود صفات الخلايا السرطانية الجذعية والمقاومة للعلاجات الكيميائية في الخطوط الخلوية السرطانية والأورام المشتقة من سرطانات الثدي [43, 44] والمبيض [24، 45] والبنكرياس [46] والكولون [25] وغيرها من السرطانات. لذا قمنا في هذا البحث بدراسة التعبير عن أهم واسمات الخلايا السرطانية الجذعية الخاصة بسرطان الثدي BCSCs وهي  $CD44^+/CD24^-$  و *ALDH1*. ويرتبط وجود هذه الخلايا السرطانية الجذعية بالقدرة على الغزو والنكس ومقاومة الأدوية [47]. في هذه الدراسة تم ملاحظة زيادة معنوية وكبيرة في تعبير الجين *ALDH1*، بينما لم يتغير التعبير في الجين *CD44* بشكل معنوي وازداد التعبير عن *CD24* في الخط الخلوي MDA-MB-231 بالمقارنة مع الخط MCF7، نستنتج من الزيادة الكبيرة في تعبير *ALDH1* (46.9 ضعف) أن خلايا الخط الخلوي MDA-MB-231 الأكثر مقاومة للسيسلاتين والكاربوبلاتين قد تكون أكثر خباثة وتملك بعض الصفات الجذعية. وتم استخدام *ALDH1* كواسم لتمييز الخلايا الجذعية السرطانية في العديد من أنواع السرطانات مثل سرطان الدم والثدي والقولون وغير ذلك [48، 49]. وقد وجد باحثون في دراسة على 577 مريضة بسرطان الثدي، أن التعبير المرتفع عن *ALDH1* يرتبط بنتائج سريرية سيئة [49]. واقتُرحت دراسة تمت على أكثر من 100 عينة مأخوذة من مريضات سرطان الثدي واللواتي عولجن بالعلاج الكيميائي paclitaxel و epirubicin أن الخلايا السرطانية الجذعية الحاملة للواسم  $ALDH1^+$  هي التي تعطي صفة المقاومة للعلاج الكيميائي وليست الخلايا الجذعية الحاملة للواسمات  $CD44^+/CD24^-$  [50].

### الاستنتاجات والتوصيات:

نستنتج من معطيات البحث ما يلي:

1. تخفض المعالجة بالسيسلاتين والكاربوبلاتين كل على حدة الحيوية الخلوية للخطين MDA-MB-231 و MCF7.
2. أدى العلاج بالسيسلاتين إلى خفض الحيوية بشكل أكبر بكثير من العلاج بمركب الكاربوبلاتين في كلا الخطين.
3. الخط MDA-MB-231 هو أكثر مقاومة للسيسلاتين والكاربوبلاتين بالمقارنة مع الخط MCF7.
4. لا ترتبط مقاومة الخط الخلوي MDA-MB-231 للعلاج بمشتقات البلاتين بتعبير البروتينات المسؤولة عن إخراج الدواء خارج الخلايا.
5. ترافقت المقاومة مع تعبير مرتفع عن واسم الخلايا الجذعية *ALDH1* و *CD24* ذلك بالمقارنة مع الخلايا MCF7 الأكثر حساسية.

وبناءً عليه يوصى بما يلي:

1. القيام بدراسات مستقبلية تستهدف الخلايا المسؤولة عن الصفات الجذعية مثل الخلايا الحاملة للجين *ALDH1* والذي من الممكن أن تكون طريقة فعالة في عكس صفة المقاومة.

2. دراسة الآليات الحيوية الأخرى التي تتدخل في المقاومة للعلاج الكيميائي مثل إصلاح DNA والموت الخلوي المبرمج وذلك على المستوى الجزيئي في الخطوط الخلوية السرطانية.
3. القيام بدراسة مشابهة على عينات سرطانية بشرية وربطها بمخرجات المرضى والعلاج مما يمكن من تحسين فعالية العلاج الكيميائي في المستقبل.
4. القيام بدراسة أثر المعالجة التأزرية بين مشتقات البلاتين وبين العلاجات الكيميائية الأخرى كالا docetaxel على الحيوية الخلوية للخطين المستخدمين في الدراسة.
5. دراسة دور الوضع الهرموني لأورام الثدي وربطه بفعالية العلاج بالسيبلاطين.
6. دراسة السبل الخلوية في الأورام المأخوذة من مريضات سرطان الثدي قبل البدء بالعلاج بمشتقات البلاتين مع التوصية باستخدام السيبلاتين مع مراعاة وضع الوظيفة الكلوية وتحمل المريضات للعلاج.

#### ملحق اختصارات:

ABCs	ATP binding cassette transporters
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
ALDH1	aldehyde dehydrogenase
Cisplatin	Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Carboplatin	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Pt
MCF-7 cell line	Michigan Cancer Foundation-7 cell line
MDA-MB-231 cell line	MDA: from M.D. Anderson and MB stands for Metastasis Breast cancer cell line

#### References:

1. WHEATE, N. J., WALKER, S., CRAIG, G. E., OUN, R. *The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials*. Dalton Trans. 39, 2010, 8113-8127.
2. OUN, R., MOUSSA, Y. E., WHEATE, N. J. *The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists*. Dalton Trans. 47, 2018, 6645-6653.
3. CAI, Z., LIU, Q. *Understanding the Global Cancer Statistics 2018: implications for cancer control*. Sci China Life Sci. 2019.
4. BROOKS, M. D., BURNES, M. L., WICHA, M. S. *Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer*. Cell Stem Cell. 17, 2015, 260-271.
5. HERNANDEZ-AYA, L. F., GONZALEZ-ANGULO, A. M. *Adjuvant systemic therapies in breast cancer*. Surg Clin North Am. 93, 2013, 473-491.
6. SHAPIRO, C. L., RECHT, A. *Side effects of adjuvant treatment of breast cancer*. N Engl J Med. 344, 2001, 1997-2008.
7. GONZALEZ-ANGULO, A. M., MORALES-VASQUEZ, F., HORTOBAGYI, G. N. *Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer*. Adv Exp Med Biol. 608, 2007, 1-22.

8. MOISEENKO, F., VOLKOV, N., BOGDANOV, A., DUBINA, M., MOISEYENKO, V. *Resistance mechanisms to drug therapy in breast cancer and other solid tumors: An opinion.* F1000Res. 6, 2017, 288.
9. SARASWATHY, M., GONG, S. *Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer.* Biotechnol Adv. 31, 2013, 1397-1407.
10. KIBRIA, G., HATAKEYAMA, H., HARASHIMA, H. *Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system.* Arch Pharm Res. 37, 2014, 4-15.
11. Gillet, J. P., Gottesman, M. M. *Mechanisms of multidrug resistance in cancer.* Methods Mol Biol. 596, 2010, 47-76.
12. MICHAEL, M., DOHERTY, M. M. *Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy.* J Clin Oncol. 23, 2005, 205-229.
13. ZHAO, H., YU, X., DING, Y., ZHAO, J., WANG, G., WU, X., et al. *MiR-770-5p inhibits cisplatin chemoresistance in human ovarian cancer by targeting ERCC2.* Oncotarget. 7, 2016, 53254-53268.
14. SILVA, S. N., TOMAR, M., PAULO, C., GOMES, B. C., AZEVEDO, A. P., TEIXEIRA, V., et al. *Breast cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in homologous recombination DNA repair pathway genes XRCC2, XRCC3, NBS1 and RAD51.* Cancer Epidemiol. 34, 2010, 85-92.
15. YU, C. J., OU, J. H., WANG, M. L., JIALIELIHAN, N., LIU, Y. H. *Elevated survivin mediated multidrug resistance and reduced apoptosis in breast cancer stem cells.* J BUON. 20, 2015, 1287-1294.
16. ROXANIS, I. *Occurrence and significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer.* J Clin Pathol. 66, 2013, 517-521.
17. GAMMON, L., MACKENZIE, I. C. *Roles of hypoxia, stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the spread and treatment resistance of head and neck cancer.* J Oral Pathol Med. 45, 2016, 77-82.
18. DAVE, B., MITTAL, V., TAN, N. M., CHANG, J. C. *Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance.* Breast Cancer Res. 14, 2012, 202.
19. HARRACH, S., CIARIMBOLI, G. *Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs.* Front Pharmacol. 6, 2015, 85.
20. FLETCHER, J. I., WILLIAMS, R. T., HENDERSON, M. J., NORRIS, M. D., HABER, M. *ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology.* Drug Resist Updat. 26, 2016, 1-9.
21. CASCORBI, I., HAENISCH, S. *Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications.* Methods Mol Biol. 596, 2010, 95-121.
22. CHEN, Z., SHI, T., ZHANG, L., ZHU, P., DENG, M., HUANG, C., et al. *Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade.* Cancer Lett. 370, 2016, 153-164.
23. DANG, H., DING, W., EMERSON, D., ROUNTREE, C. B. *Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics.* BMC Cancer. 11, 2011, 396.
24. HOJO, N., HUISKEN, A. L., WANG, H., CHIRSHEV, E., KIM, N. S., NGUYEN, S. M., et al. *Snail knockdown reverses stemness and inhibits tumour growth in ovarian cancer.* Sci Rep. 8, 2018, 8704.

25. FAN, F., SAMUEL, S., EVANS, K. W., LU, J., XIA, L., ZHOU, Y., *et al.* Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med.* 1, 2012, 5-16.
26. BYERS, L. A., DIAO, L., WANG, J., SAINTIGNY, P., GIRARD, L., PEYTON, M., *et al.* An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 19, 2013, 279-290.
27. GROSSE-WILDE, A., FOUQUIER D'HEROUDEL, A., MCINTOSH, E., ERTAYLAN, G., SKUPIN, A., KUESTNER, R. E. *et al.* Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. *PLoS One.* 10, 2015, e0126522.
28. RICARDO, S., VIEIRA, A. F., GERHARD, R., LEITAO, D., PINTO, R., CAMESELLE-TEIJEIRO, J. F., *et al.* Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 64, 2011, 937-946.
29. PHI, L. T. H., SARI, I. N., YANG, Y. G., LEE, S. H., JUN, N., KIM, K. S., *et al.* Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int.* 2018, 2018, 5416923.
30. NUNES, T., HAMDAN, D., LEOEUF, C., EL BOUCHTAOUI, M., GAPIHAN, G., NGUYEN, T. T., *et al.* Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *Int J Mol Sci.* 19, 2018.
31. BERRIDGE, M. V., HERST, P. M., TAN, A. S. *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.* *Biotechnol Annu Rev.* 11, 2005, 127-152.
32. MAKOVEC, T. *Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy.* *Radiol Oncol.* 53, 2019, 148-158.
33. WANG, D., LIPPARD, S. J. *Cellular processing of platinum anticancer drugs.* *Nat Rev Drug Discov.* 4, 2005, 307-320.
34. BARTSCH, R., WENZEL, C., STEGER, G. G. *Trastuzumab in the management of early and advanced stage breast cancer.* *Biologics.* 1, 2007, 19-31.
35. DECATRIS, M. P., SUNDAR, S., O'BYRNE, K. J. *Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status.* *Cancer Treat Rev.* 30, 2004, 53-81.
36. MCDERMOTT, M., EUSTACE, A. J., BUSSCHOTS, S., BREEN, L., CROWN, J., CLYNES, M., *et al.* *In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies.* *Front Oncol.* 4, 2014, 40.
37. GO, R. S., ADJEL, A. A. *Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin.* *J Clin Oncol.* 17, 1999, 409-422.
38. ZHANG, W., FENG, M., ZHENG, G., CHEN, Y., WANG, X., PEN, B., *et al.* Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 417, 2012, 679-685.
39. TASSONE, P., TAGLIAFERRI, P., PERRICELLI, A., BLOTTA, S., QUARESIMA, B., MARTELLI, M. L., *et al.* BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells. *Br J Cancer.* 88, 2003, 1285-1291.

40. BALAJI, S. A., UDUPA, N., CHAMALLAMUDI, M. R., GUPTA, V., RANGARAJAN, A. *Role of the Drug Transporter ABCC3 in Breast Cancer Chemoresistance*. PLoS One. 11, 2016, e0.155013
41. SZAKACS, G., ANNEREAU, J. P., LABABIDI, S., SHANKAVARAM, U., ARCIELLO, A., BUSSEY, K. J., *et al.* *Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells*. Cancer Cell. 6, 2004, 129-137.
42. REED, K., HEMBRUFF, S. L., SPROWL, J. A., PARISSENTI, A. M. *The temporal relationship between ABCB1 promoter hypomethylation, ABCB1 expression and acquisition of drug resistance*. Pharmacogenomics J. 10, 2010, 489-504.
43. MANI, S. A., GUO, W., LIAO, M. J., EATON, E. N., AYYANAN, A., ZHOU, A. Y., *et al.* *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell. 133, 2008, 704-715.
44. LI, X., STRIETZ, J., BLEILEVENS, A., STICKELER, E., MAURER, J. *Chemotherapeutic Stress Influences Epithelial-Mesenchymal Transition and Stemness in Cancer Stem Cells of Triple-Negative Breast Cancer*. Int J Mol Sci. 21, 2020.
45. HAN, X., DU, F., JIANG, L., ZHU, Y., CHEN, Z., LIU, Y., *et al.* *A2780 human ovarian cancer cells with acquired paclitaxel resistance display cancer stem cell properties*. Oncol Lett. 6, 2013, 1295-1298.
46. IZUMIYA, M., KABASHIMA, A., HIGUCHI, H., IGARASHI, T., SAKAI, G., IIZUKA, H., *et al.* *Chemoresistance is associated with cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells*. Anticancer Res. 32, 2012, 3847-3853.
47. HUANG, J., LI, H., REN, G. *Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review)*. Int J Oncol. 47, 2015, 840-848.
48. VISVADER, J. E., LINDEMAN, G. J. *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. Nat Rev Cancer. 8, 2008, 755-768.
49. GINESTIER, C., HUR, M. H., CHARAFE-JAUFFRET, E., MONVILLE, F., DUTCHER, J., BROWN, M., *et al.* *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell. 1, 2007, 555-567.
50. TANEL, T., MORIMOTO, K., SHIMAZU, K., KIM, S. J., TANJI, Y., TAGUCHI, T., *et al.* *Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers*. Clin Cancer Res. 15, 2009, 4234-4241.