

Cell Anatomy Study of MyoSatellite Cells after Breast Cancer Chemotherapy

Dr. Abduljawad koubili*

Dr. Ali Daod**

Bassam Sarem***

(Received 7 / 1 / 2023. Accepted 19 / 2 / 2023)

□ ABSTRACT □

Study involved tow randomized groups with invasive breast cancer Stage IIIA. The control group included 31 samples before chemotherapy while the cases (oppose) one included 49 patients after AC (Doxorubicin plus Cyclophosphamide) is finished. Skeletal muscle biopsies performed using needle biopsy. Electron microscope study performed at the Atomic Energy Agency. Results revealed significant nucleus anomalies in 73.46% of MyoSatellite cells of cases samples whereas the rate was 22.59% for control ones.

Keywords: Electron microscope, MyoSatellite, Fatigue.

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

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

*** PhD internal scholarship, Department of Cytology and Histology, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia.

دراسة تشريحية خلوية للخلايا العضلية التابعة بعد المعالجة الكيماوية لسرطان الثدي

د. عبد الجواد قبيلي*

د. علي داود**

بسام صارم***

(تاريخ الإيداع 7 / 1 / 2023. قُبِلَ للنشر في 19 / 2 / 2023)

□ ملخص □

تم اختيار عينة عشوائية من مريضات مشخّص لهنّ سرطان ثدي غازي Stage IIIA وتوزعت عينة الدراسة في مجموعتين شملت مجموعة الشاهد 31 مريضة قبل تلقي العلاج الكيماوي وشملت مجموعة الحالات (التعرض) 49 مريضة بعد انتهاء المعالجة الكيماوية AC المتضمنة مشاركة Doxorubicin و Cyclophosphamide. تم أخذ خزع عضلية هيكلية باستخدام needle biopsies أجريت الدراسة باستخدام المجهر الالكتروني لدى هيئة الطاقة الذرية. أظهرت النتائج شذوذات معتبرة على مستوى نوى الخلايا العضلية التابعة MyoSatellite Cells لعينات التعرض للعلاج الكيماوي بنسبة 73.46% بينما سجلت عينات الشاهد شذوذات معتبرة على مستوى النواة بنسبة 22.59%.

الكلمات المفتاحية: المجهر الالكتروني - الخلايا العضلية التابعة - التعب العضلي.

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

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

*** طالب دكتوراه، قسم التشريح، كلية الطب، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مقدمة

تعاني 99% من المريضات من درجة من التعب العضلي^{1,2} Fatigue خلال العلاج الكيماوي Chemotherapy لسرطان الثدي الغازي Invasive Breast Cancer. وفي 70% من الحالات^{3,4} يحدث دنف Cachexia معتدل إلى moderate شديد ويستمر لأشهر وأحياناً سنوات^{5,6} بعد انتهاء العلاج الكيماوي.

يشير الدنف⁷ إلى فقدان الوزن على حساب النسيج العضلي والدهني بنسبة تفوق 5% من وزن الجسم خلال 12 شهر دون أن يكون هناك برنامج لتخفيض الوزن ويتضمن الدنف ضعف القوة العضلية muscle strength فقدان الشهية والتعب ويشاهد في المراحل المتأخرة من الأمراض الخطيرة كالسرطان، الايدز COPD، أمراض الكلية، قصور القلب الاحتقاني.

يشار للتعب العضلي على أنه شعور شخصي بالإرهاق tiredness والضعف weakness وفقدان الطاقة lack of energy ويحدث نتيجة عوامل عديدة⁸ منها الجهد الفيزيائي والدهني والمعالجات الطبية والعوامل النفسية خاصة اضطرابات المزاج وفي سرطان الثدي الغازي يحدث التعب العضلي بسبب المرض نفسه والعلاج الكيماوي. تشير الاحصاءات إلى أن سرطان الثدي يمثل 30% من إجمالي السرطانات المشخصة عند الاناث مع مجال عمري 45-65 سنة^{10,9}.

يعتبر تصنيف^{12,11} TNM staging أشيع معيار لتصنيف سرطان الثدي كما توجد معايير إضافية^{14,13} للتصنيف تعتمد على وجود/غياب مستقبلات الأستروجين ER، البروجسترون PR، بروتين ERBB2. وتشير مرحلة^{16,15} Stage IIIA لسرطان الثدي الغازي إلى ورم بأي حجم منتشر لـ 4-9 عقد ابطيه دون أي انتشار لبقية أجزاء الجسم (M0) أو ورم أكثر من 50 ملم منتشر لـ 1-3 عقد ابطيه.

يستخدم Doxorubicin وهو صاد حيوي من زمرة^{18,17} Anthracyclines بشكل واسع في علاج العديد من السرطانات^{20,19}. وفي سرطان الثدي الغازي تتم مشاركته مع Cyclophosphamide ضمن بروتوكول^{22,21} AC. يثبط^{24,23} Doxorubicin أنزيم topoisomerase II ما يمنع حلزون DNA من التسخ replication كما أنه يتأكسد إلى مركب غير ثابت ينتج عن ارجاعه في المتقدرات إنتاج mitochondrial reactive oxygen species (ROS) تخرب الغشاء الخلوي وتقلل سبيل الموت الخلوي المبرمج^{26,25} (الاستماتة) apoptosis. بألية مشابهة تؤكد أنزيمات السييتوكروم C450 cyclophosphamide^{28,27} وينتج عن ارجاعه مركبات²⁹ mitochondrial reactive oxygen species (ROS) تخرب الغشاء الخلوي والمتقدرات والـ DNA وتقلل بروتينات Caspase cascade وهي أنزيمات protease تلعب دور هام في الاستماتة الخلوية.

يقدر أن الخلايا العضلية التابعة³⁰ MyoSatellite Cells تمثل 30% من تعداد النوى العضلية لدى حديثي الولادة وتتناقص النسبة مع التقدم بالعمر وتعتبر مصدر للأنوية الجديدة المطلوبة من أجل نمو وتضخم الألياف العضلية³¹ muscle fibers ويعتمد طول الليف العضلي إلى حد ما على عدد الأنوية ضمن الليف، تتقلل الخلايا التابعة عند تأذي الألياف العضلية حيث تنقسم وتتضمم للألياف المتأذية لتعويض الأنوية التي خسرها الليف العضلي بسبب المرض أو الأذية³².

أهمية وأهداف البحث:

- تأتي أهمية البحث من دراسة التأثير السمي للأدوية المستخدمة في العلاج الكيماوي للسرطان على مستوى البنية الخلوية وتحت الخلوية للخلايا العضلية التابعة في وقت تشير فيه الدراسات إلى حدوث التعب بعد العلاج الكيماوي بنسبة 60-70% كأحد أشيع الآثار الجانبية لهذا العلاج ويهدف البحث إلى:
- دراسة التبدلات الشكلية والبنوية على مستوى الخلايا العضلية التابعة بعد المعالجة الكيماوية لسرطان الثدي الغازي.
 - تقييم السمية الخلوية للعلاج الكيماوي على الخلايا العضلية التابعة من خلال الخزعة.

طرائق البحث ومواده

تم اختيار عينة عشوائية من مريضات مشخّص لهنّ سرطان ثدي غازي Stage IIIA حسب تصنيف (TNM) وتوزعت عينة الدراسة في مجموعتين:

مجموعة الشاهد Control: شملت 23 مريضة قبل تلقي العلاج الكيماوي.

مجموعة الحالات (التعرض) Cases: شملت 48 مريضة بعد 2-3 أسابيع من انتهاء المعالجة الكيماوية AC المتضمنة مشاركة بين Doxorubicin (Adriamycin) بجرعة 60 mg/m^2 و Cyclophosphamide بجرعة 600 mg/m^2 وذلك في دورة من ثلاث جرعات بفواصل 2-3 أسابيع بين الجرعات. تم أخذ خزع عضلية هيكلية باستخدام needle biopsies تحت التخدير الموضعي وأجريت الدراسة باستخدام المجهر الإلكتروني لدى هيئة الطاقة الذرية.

اعتمدت منهجية البحث العلمي للدراسة على تصميم الحالة- شاهد وحساب الدالات الإحصائية الخاصة بمعامل الأرجحية لهذا التصميم.

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

تم ضبط دقة القياس من خلال وضع التعريف التالي:

شذوذات النواة nucleus anomalies: أي مما يلي: (تشوه شكل Shape النواة، تقطع الكروماتين وتكتفه بشكل يقع على محيط النواة، تقنت النواة Fragmentation).

الدراسة بالمجهر الإلكتروني:

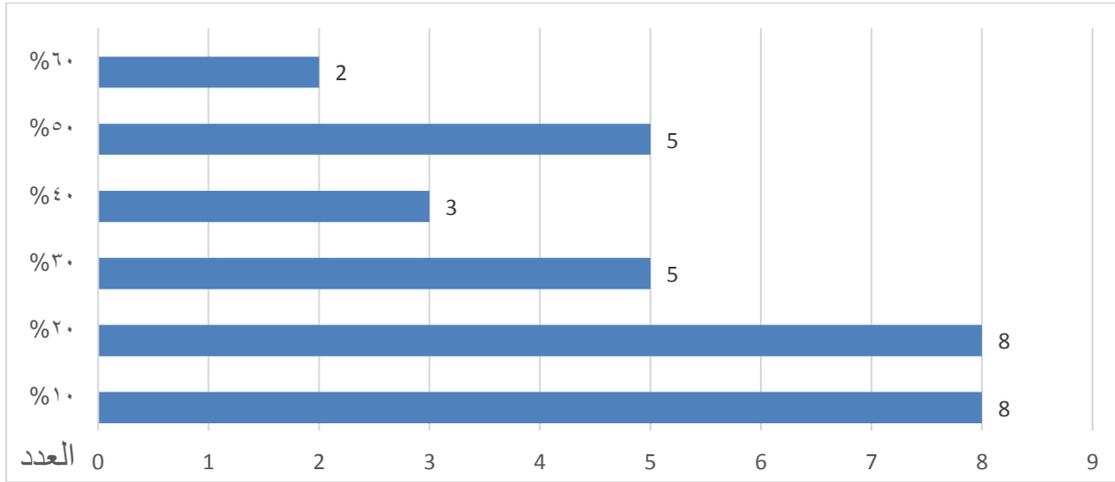
- تقطيع الخزعات بأبعاد $1 \times 1 \times 3-5 \text{ mm}$
- غسل في درجة حرارة الغرفة 37°C باستخدام phosphate buffer 1/15 M pH 7.4 3 مرات لمدة 10 دقائق في كل مرة.
- التثبيت Fixation باستخدام 2.5% glutaraldehyde لمدة 3 ساعات بدرجة 37°C
- غسل باستخدام phosphate buffer 1/15 M pH 7.4 بدرجة حرارة الغرفة 37°C
- التشريب Embedding بالبارافين للحصول على الكاسيت
- التقطيع Slicing باستخدام ميكروتوم Microtome آلي إلى مقاطع بسماكة 1 و 5 ميكرون

- فرد المقاطع Sections على حوض مائي مضبوط الحرارة على 55°C ثم أخذها على شرائح مجهرية slides
 - إزالة البارافين باستخدام الكزيلول Xylool الدافئ بدرجة حرارة 55°C لمدة 5 دقائق
 - إزالة الماء dehydration باستخدام الإيثانول 100% لمدة 5 دقائق
 - توضع العينات في 95% ethanol لمدة 5 دقائق
 - توضع العينات في isoamyl acetate لمدة 5 دقائق
 - تعامل الشرائح بأوكسيد الأوسميوم 1% OsO4 لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4°C
 - تجفف العينات ثم تدرس بالمجهر الإلكتروني
- تم استخدام حزمة الكترونية 30KV بسرعة 6 وتراوحت قوة التكبير بين 3.00-6.00 Kx وتم استخدام حزمة مركزة والظهار على كاشف VEGA//TESCAN، اعتمد تقييم العينة على دراسة 10 خلايا عضلية تابعة تم اختيارها بشكل عشوائي.

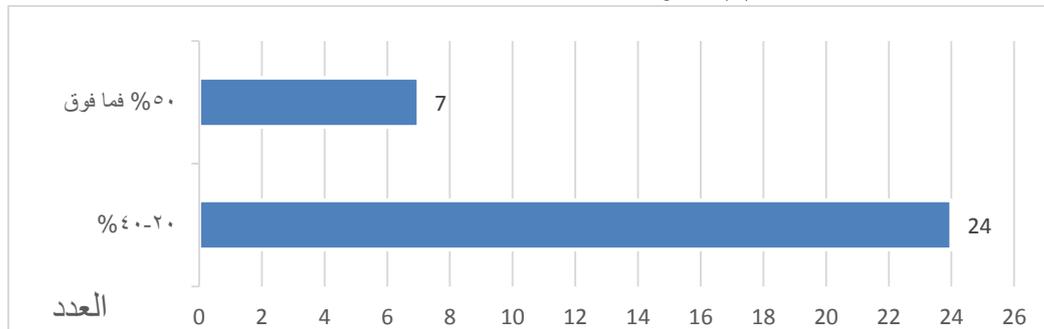
النتائج:

مجموعة الشاهد:

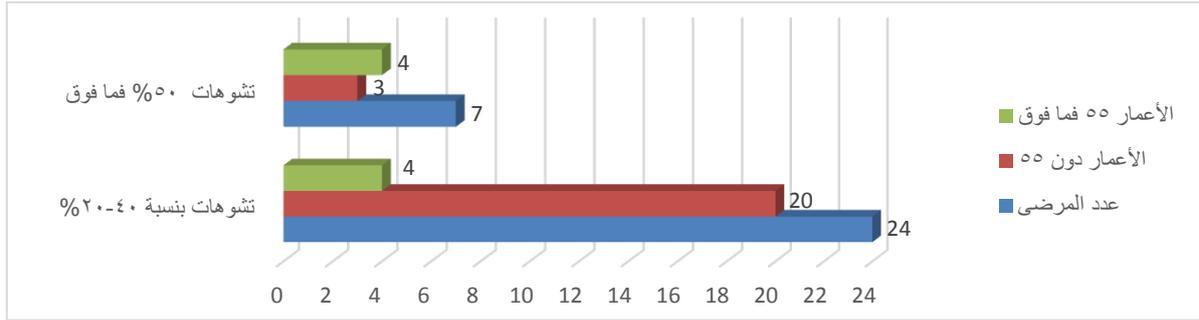
تراوحت الأعمار بين 46 – 62 سنة، وكانت نتائج الدراسة بالمجهر الإلكتروني على النحو التالي:



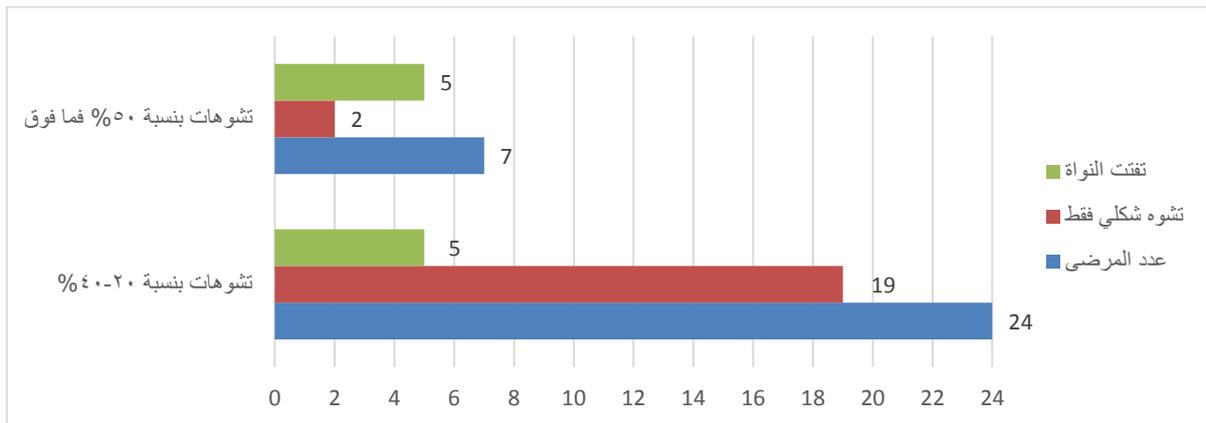
مخطط (1) يوضح عدد العينات الموافق لنسب التشوهات المشاهدة



مخطط (2) يوضح توزيع عدد العينات ضمن مجالات نسب التشوهات 20-40%، 50% فما فوق



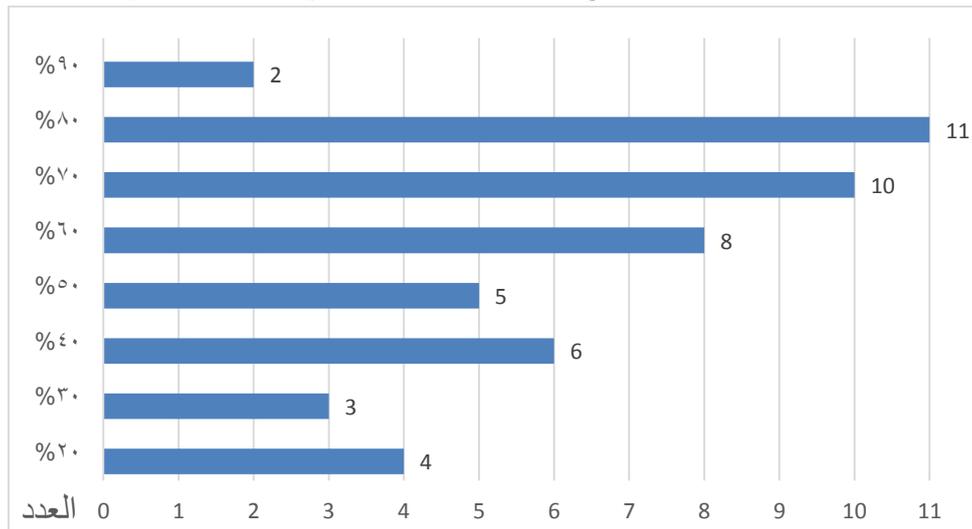
مخطط (3) توزيع نسب التشوهات المشاهدة تبعاً للأعمار



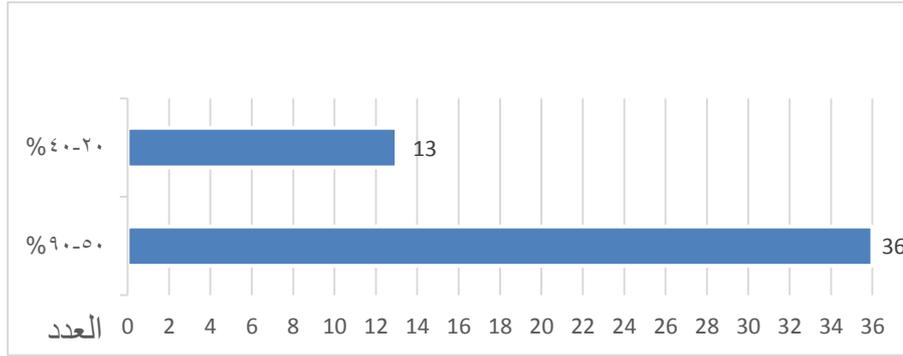
مخطط (4) توزيع نسب التشوهات المشاهدة تبعاً لنموذج التشوه

مجموعة الحالات (التعرض):

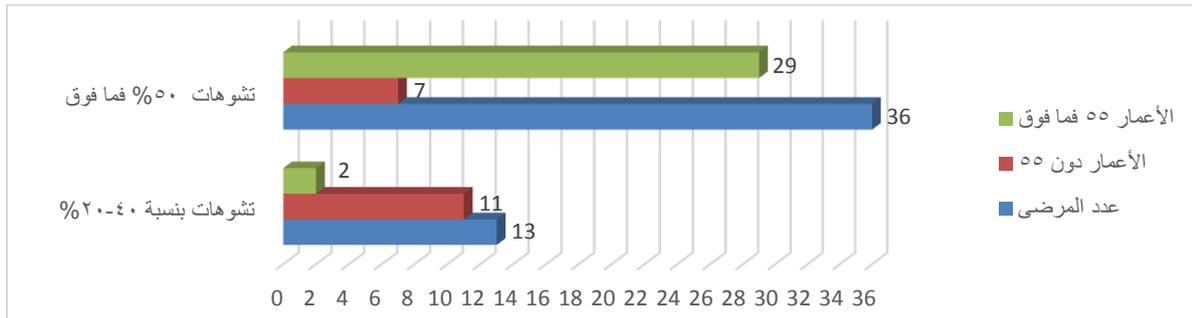
تراوحت الأعمار بين 48 - 65 سنة، وكانت نتائج الدراسة بالمجهر الالكتروني على النحو التالي:



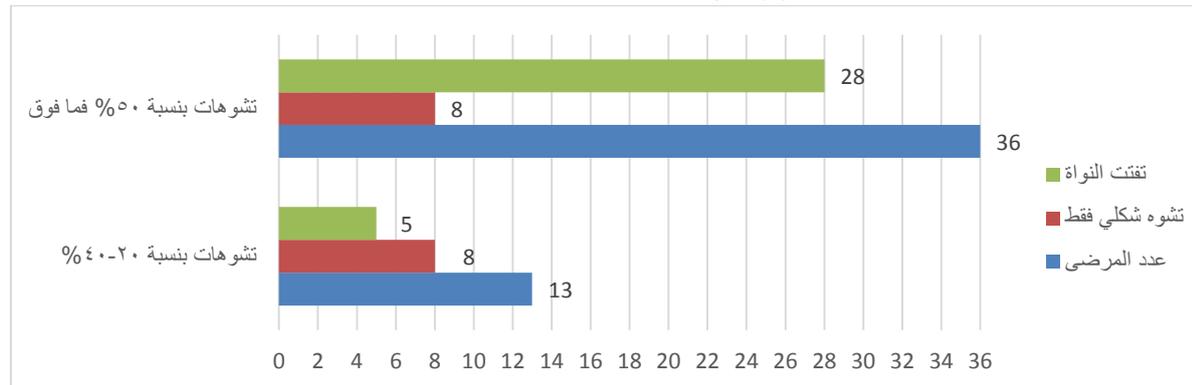
مخطط (5) يوضح عدد العينات الموافقة لنسب التشوهات المشاهدة



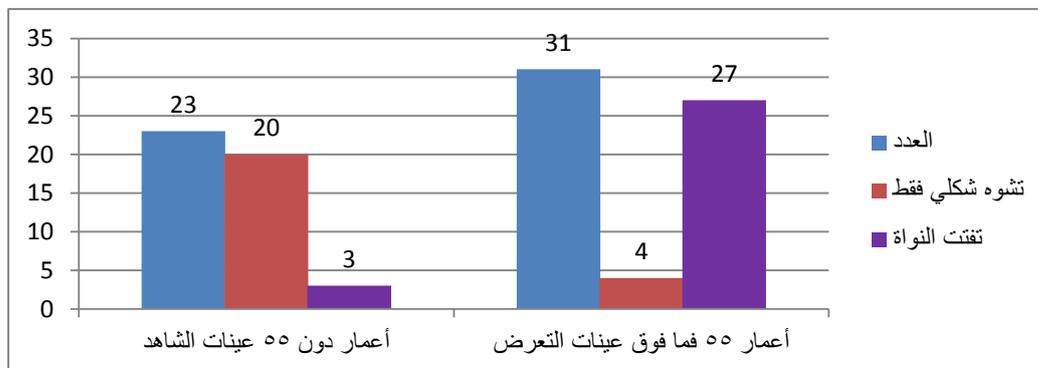
مخطط (6) يوضح عدد العينات ضمن مجالات نسب التشنوهات 20-40%، 50-90%



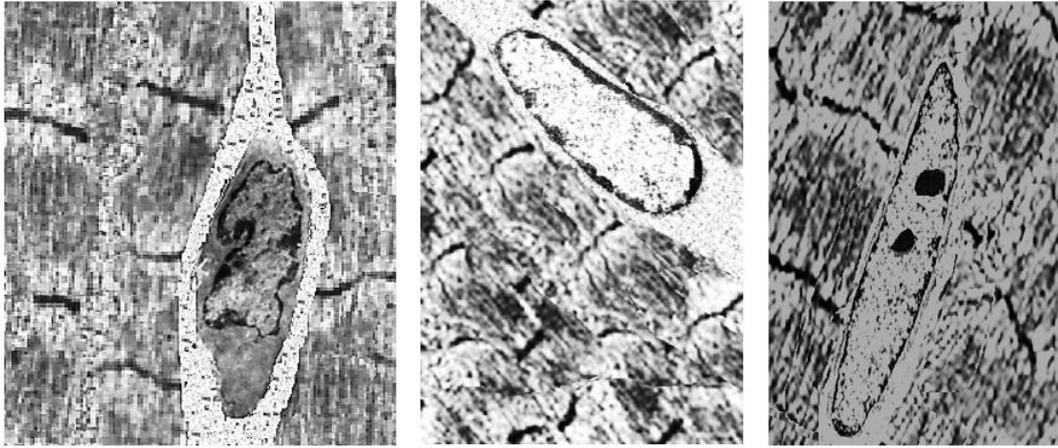
مخطط (7) توزيع نسب التشنوهات المشاهدة تبعاً للأعمار



مخطط (8) توزيع نسب التشنوهات المشاهدة تبعاً لنموذج التشنو



مخطط (9) يوضح توزيع نموذج التشنوهات المشاهدة ضمن الفئات العمرية لمجموعتي الشاهد والتعرض



مصور (3)

مصور (2)

مصور (1)

مصور (1) يظهر تفتت نواة الخلية العضلية التابعة MS، مصور (2) يظهر تكثف الكروماتين على محيط النواة MS، مصور (3) يظهر تشوه شكل النواة MS وذلك بنتيجة الدراسة بالمجهر الالكتروني.

المناقشة:

* يظهر المخطط (1)، (2) أن 24 عينة من عينات الشواهد البالغة 31 عينة شوهدت فيها تشوهات النوى بنسبة 20-40% من النوى المدروسة أي بنسبة 77.41% من عينات الشواهد مقابل 22.59% من العينات سجلت تشوهات معتبرة في النوى بنسبة 50% فما فوق.

لم تسجل بين عينات الشواهد تشوهات نوى بنسبة أكبر من 60% من النوى المدروسة واقتصرت نسبة التشوه 60% على عینتين فقط من عينات الشواهد أي بنسبة 6,45%.

وبحساب معامل الأرجحية (OR) كانت القيمة أقل من واحد أي أن معظم تشوهات النوى المشاهدة في عينات الشاهد كانت خفيفة إلى معتدلة بنتيجة فروق حقيقية وليس بمحض الصدفة.

* يظهر المخطط (3)، (4) أن عينات الشواهد التي شوهدت فيها تشوهات النوى بنسبة 20 - 40% من النوى المدروسة والبالغة 24 عينة كان منها 20 عينة لأعمار دون 55 سنة أي بنسبة 83.33% وكان منها 19 عينة اقتصرت فيها التشوهات المشاهدة على التشوه الشكلي في النواة فقط أي بنسبة 79,16% وبحساب معامل الأرجحية كانت القيمة أقل من واحد.

* يظهر المخطط (5)، (6) أن 36 عينة من عينات التعرض قد شوهدت فيها تشوهات النوى بنسبة معتبرة 50 - 60% من النوى المدروسة أي بنسبة 73.46% من عينات التعرض.

وبحساب معامل الأرجحية (OR) كانت القيمة أقل من واحد أي أن معظم تشوهات النوى المشاهدة في عينات التعرض كانت تشوهات بنسبة معتبرة نتيجة فروق حقيقية وليس بمحض الصدفة.

* يظهر المخطط (7)، (8) أن عينات التعرض التي شوهدت فيها تشوهات النوى بنسبة 50 - 60% من النوى المدروسة والبالغة 36 عينة كان منها 29 عينة لأعمار 55 فما فوق أي بنسبة 80.55% وكان منها 28 عينة أظهرت تفتت في النوى أي بنسبة 77,77% وبحساب معامل الأرجحية كانت القيمة أقل من واحد.

* يظهر المخطط رقم (9) أن تشوهات النوى المسجلة لعينات الشواهد في الأعمار دون 55 وبالبالغة 23 عينة اقتصرت على تشوه شكلي في 20 عينة أي بنسبة 86,95%، وأن تشوهات النوى المسجلة لعينات التعرض في الأعمار 55 فما فوق وبالبالغة 31 عينة أظهرت تفتت النوى في 27 عينة أي بنسبة 87.09% وبحساب معامل الأرجحية كانت القيمة أقل من واحد.

* في دراسة مقارنة³³ بعنوان *Doxorubicin impacts muscle satellite cell and capillary* أجريت عام 2019 في ولاية Arizona جامعة Midwestern شملت 524 مريضة مصابة بسرطان الثدي الغازي وتمت دراسة الخزع العضلية قبل وبعد العلاج الكيماوي AC بالمجهر الالكتروني أظهرت النتائج تشوهات معتبرة في نوى الخلايا العضلية التابعة (تفتت) بنسبة 26% لدى مريضات سرطان الثدي الغازي قبل الخضوع للعلاج الكيماوي وأصبحت النسبة 69% بعد الخضوع للعلاج الكيماوي بينما كانت النسبة في دراستنا 73.46% وهي نسب قريبة من دراستنا.

* في دراسة مقارنة³⁴ بعنوان *Adriamycin-induced muscle satellite cell by DNA topoisomerase II* أجريت في Johns Hopkins Medical School ولاية Maryland شملت مجموعتين من مريضات سرطان الثدي الغازي. مجموعة الشاهد (125 مريضة) قبل تلقي العلاج الكيماوي AC، ومجموعة التعرض (280 مريضة) بعد تلقي العلاج الكيماوي وتمت دراسة الخزع العضلية بالمجهر الالكتروني وأظهرت النتائج تشوهات معتبرة في نوى الخلايا العضلية التابعة لمجموعة التعرض بنسبة 70% بينما كانت في مجموعة الشاهد 28% وهي نسب قريبة من دراستنا ويمكن تفسير الفروقات مع الدراسات المقارنة بالعوامل الاثنية والبيئية وفروقات الاعتيان.

الاستنتاجات والتوصيات:

- برامج الكشف الدوري المبكر لسرطان الثدي تجنب السيدات الآثار الجانبية للعلاج الكيماوي.
- التقدم بالعمر فوق 55 سنة عامل خطر يزيد من الآثار السمية للعلاج الكيماوي على مستوى الخلايا العضلية التابعة.
- التأذي الواضح لنوى الخلايا العضلية التابعة بعد العلاج الكيماوي يفسر إلى حد ما شدة واستمرارية التعب المشاهد بعد العلاج الكيماوي.

References:

1. BLESCH, K.S.; PAICE, J.A.; WICKHAM, R. *Correlates of fatigue in people with breast or lung cancer*. Oncol Nurs Forum, 2008
3. IRVINE, D.; VINCENT, L.; GRAYDON, J.E. *The prevalence and correlates of fatigue in patients receiving treatment with chemotherapy and radiotherapy*. Cancer Nurs, 2010
5. BLESCH, K.S.; PAICE, J.A.; WICKHAM, R. *Correlates of fatigue in people with breast or lung cancer*. Oncol Nurs Forum, 2009
7. IRVINE, D.; VINCENT, L.; GRAYDON, J.E. *The prevalence and correlates of fatigue in patients receiving treatment with chemotherapy and radiotherapy*. Cancer Nurs, 2008
9. ANDRYKOWSKI, M.A.; CURRAN, S.L.; LIGHNER, R. *Off-treatment fatigue in breast cancer survivors: A controlled comparison*. Behav Med, 2006
11. BROECKEL, J.A.; JACOBSEN, P.B.; HORTON, J. *Characteristics and correlates of fatigue after adjuvant chemotherapy for breast cancer*. Clin Oncol, 2008
13. GLAUS, A. *Fatigue in patients with cancer*. Recent Results Cancer Res, 2006

15. MIASKOWSKI, C.; PORTENOY, R.K. Update on the assessment and management of cancer-related fatigue. Principles Practice Supportive. Oncol Updates, 2010
17. SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021, 209-249
18. SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. CA Cancer J. Clin. 2020, 7–30
19. GENNARI, A.; ANDRÉ, F.; BARRIOS, C.H. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. Ann Oncol, 2021, 1475-1495
20. WAKS, A.G.; WINER, E.P. Breast Cancer Treatment: A Review. Waks Jama, 2019, 288-300
21. HARBECK, N.; PENNAULT-LLORCA, F.; CORTES, J. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers, 2019, 66
22. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. 2019
23. Hortobagyi, G.N.; Connolly, J.L.; D'orsi, C.J. Cancer Staging Manual 8th, Breast, Part XI, 2022
24. HIENSCH, A.E.; BOLAM, K.A.; MIJWEL, S. *Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways*. Acta Physiol, 2020, 229
25. RIVANKAR, S. *An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy*. J Cancer Res Ther, 2014, 853-858
26. BAXTER-HOLLAND, M.; DASS, C.R. *Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use*. J Pharm Pharmacol, 2018. 320-327
27. HUANG, S.C.; Wu, J.F.; SAOVIENG, S. *Doxorubicin inhibits muscle inflammation after eccentric exercise*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017, 277-284
28. RUSSO, C.; LAVORGNA, M.; ČESEN, M.; KOSJEK, T.; HEATH, E.; ISIDORI, M. *Evaluation of acute and chronic ecotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and UV treated samples*. Environ Pollut, 2018, 356–363
29. ČESEN, M.; ELERŠEK, T.; NOVAK, M.; ŽEGURA, B.; KOSJEK, T.; FILIPIČ, M.; HEATH, E. *Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, metabolites/transformation products*. Environ Pollut, 2016, 92–201.
30. ADAMS, G. R.; CAIOZZO, V. J.; HADDAD, F; BALDWIN, K. M. *Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation*. Am. J. Physiol. Cell, 2006, 82-95
31. ANTUNES-FOSCHINI, R. M.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N.; and BICAS, H. E. *Increased frequency of activated satellite cells in overacting inferior oblique muscles from humans*. Invest. Ophthalmol. Vis, 2006, 60-65
32. BJORNSON, C. R.; CHEUNG, T. H.; LIU, L.; TRIPATHI, P. V.; STEEPER, K. M.; RANDO, T. A. *Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells*. Stem Cells, 2016, 80-96
33. Kaylin, R.; Sweeney, R.; Brightwell, M. *Doxorubicin impacts muscle satellite cell and capillary*. College of Health Solutions, Arizona State University, 2019
34. Yang, L.; Halligan, B. D.; Liu, L. F. *Adriamycin-induced muscle satellite cell by DNA topoisomerase II*. Johns Hopkins Medical School, Baltimore, 2018