

فارماکوژنومیک و سلول‌های بنیادی سرطان

محمد رضا نوری دلویی^۱، نادر عبادی^۲^۱ استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

فارماکوژنومیک در زمینه سرطان هم چنان به عنوان مناسب‌ترین راهکار برای درمان فردی بیماران در نظر گرفته می‌شود، اگرچه تاکنون کاربرد بالینی آنها به چند ژن محدود بوده است. در شماری از سرطان‌ها رابطه بین ژنوتیپ و نتایج بالینی امیدبخش بوده است، اما از آن جا که اغلب مطالعات فارماکوژنومیک جاری به نقش در حال ظهور سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs, cancer stem cells) در حساسیت و مقاومت در برابر داروها توجهی نداشته است، نتایج پرفروغی حاصل نگردیده است. سلول‌های بنیادی سرطانی به عنوان یک ریز جمعیت سلولی در تومورها، ظاهراً تنها سلول‌های آغاز کننده تومورهای سرطانی در یک بدخیمی هستند و به همین دلیل در راس رده‌بندی سلول‌های سرطانی قرار می‌گیرند. با این حال، مطالعات فارماکوژنومیکی تفاوت‌های ژنتیکی موجود در مسیرهای پیام‌رسانی ویژه‌ای که در این سلول‌ها به نحو متمایزی از دیگر سلول‌ها فعال‌تر است، نادیده گرفته است. افزون بر این، در بسیاری از بدخیمی‌ها، سلول‌های بنیادی سرطانی نشان دهنده یک زیرجمعیت نادر است. بنابراین، کل نیمرخ بیانی تومورها ممکن است در اصل تحت تاثیر الگوهای بیانی سلول‌های بنیادی سرطانی باشند. در این مقاله مروری، شواهد موجود در مقاومت دارویی سلول‌های بنیادی سرطانی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که چگونه تغییرات ژنتیکی رایج در ژن‌های مربوط به سلول‌های بنیادی سرطانی ممکن است پیش‌بینی کننده پاسخ فرد به عامل‌های ضد سرطانی باشد. هم‌چنین، دیدگاه‌ها و راهکارهای جدید در شناسایی این سلول‌ها مورد بحث قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: فارماکوژنومیک، سرطان، سلول‌های بنیادی سرطانی.

مقدمه

خواهند داد (۱). بنابراین سرطان یک مشکل بزرگ برای سلامت همه جوامع بشری است. هم‌چنین و متأسفانه سرطان بیماری متنوعی در سطوح بافتی، توموری و سلولی است و این گوناگونی اصلی‌ترین چالش در تشخیص اختصاصی بوده و به تبع آن درمان‌های غیر اختصاصی و نامناسب را موجب می‌شود (۲، ۳). از این رو مطالعات گسترده در زمینه تشخیص اختصاصی و درمان مناسب در سرطان امری حیاتی است. فارماکوژنومیک به عنوان یک دانشی نو که به بررسی استعداد افراد در پاسخ‌گویی به درمان‌های متفاوت دارویی می‌پردازد، زمینه مناسبی را برای پاسخ‌گویی به پرسش‌هایی پیرامون واکنش متفاوت افراد در برابر انواع درمان‌های سرطانی فراهم نموده است. بنابراین، این دانش می‌تواند در پیش‌برد هدف‌های

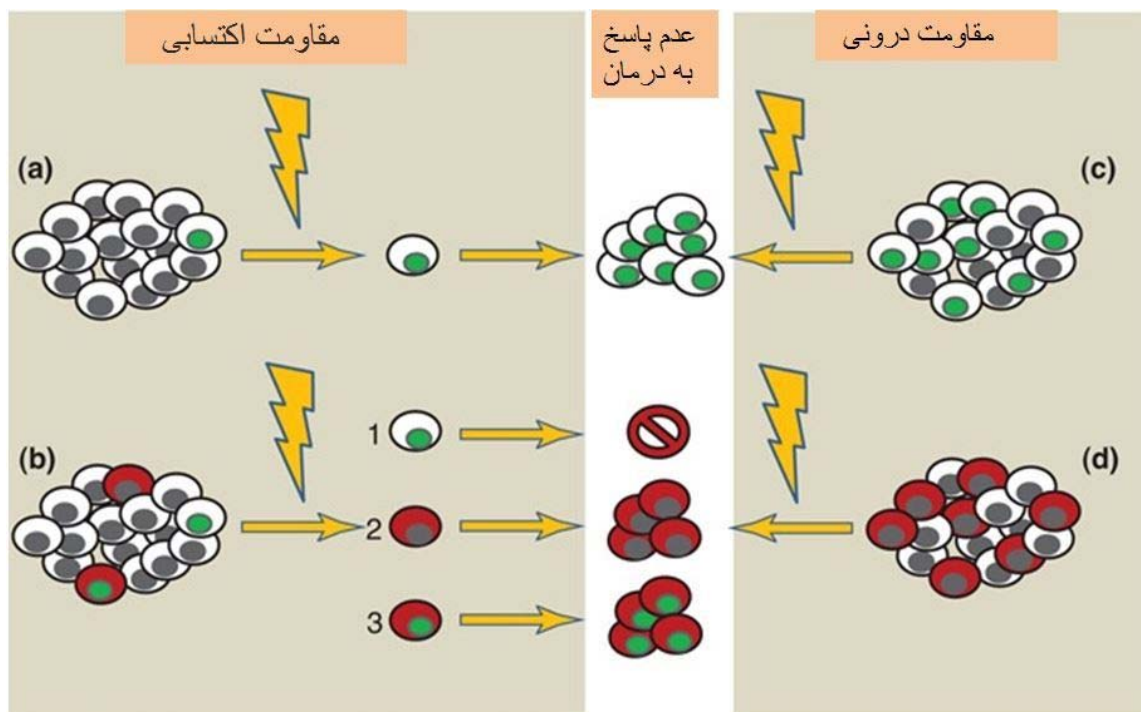
سرطان دومین علت مرگ و میر در جهان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی به شمار می‌آید. سرطان بیماری جدیدی نیست و از گذشته تاکنون انسان‌های بسیاری در سراسر جهان به آن مبتلا شده و جان خود را از دست داده‌اند. هم‌چنین و به صورت روز افزون به نرخ مبتلایان بیماران سرطانی در جهان افزوده شده است و پیش‌بینی شده است که در سال ۲۰۱۴ در کشور آمریکا حدود ۱۶۶۵۵۴۰ نفر به سرطان مبتلا خواهند شد و ۵۸۵۷۲۰ نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دکتر

محمد رضا نوری دلویی (email: nooridalooi@sina.tums.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۱



شکل ۱- الگوی مقاومت دارویی. با توجه به الگوی پیشرفت تصادفی سرطان، مقاومت دارویی می‌تواند به علت جهش موجود از پیش یا جهش جدید (سلول‌های جهش‌های یافته با هسته سبز نشان داده شده) در سلول‌های هر تومور سرطانی به وجود آمده باشد. با توجه به مدل CSC، مقاومت دارویی اکتسابی که از CSCs منشا گرفته است (سلول‌های با رنگ قرمز)، مقاومت می‌تواند به علت جهش موجود از پیش یا جهش جدید پس از شیمی درمانی به وجود آمده باشد. جهش در سلول‌های سرطانی غیر بنیادی موثر نخواهد بود، به این دلیل که این سلول‌ها توانایی تکثیر در تومور ندارند (۱۳).

بر دیگر سلول‌های سرطانی غلبه می‌کنند. این الگو برای توضیح بدخیمی، متاستاز و مقاومت دارویی ارائه گردیده است (۸). شیمی درمانی، به عنوان یک فشار انتخابی عمل می‌کند، بدین نحو که به گسترش کلونی‌هایی که مقاومت دارویی را اکتساب کرده‌اند، کمک می‌کند (شکل ۱). در خلال دهه ۱۹۸۰، Goldie و Coldman یک الگوی ریاضی برای رشد تومورهای پس از درمان ارائه دادند که هم‌چنان به عنوان استاندارد طلایی محسوب می‌شود. در این الگو، پیش‌بینی می‌شود که مقاومت دارویی اکتسابی می‌تواند با استفاده از دوز بالای دارو و یا ترکیبی از شیمی درمانی‌ها در مراحل اولیه برطرف گردد. از سوی دیگر، در برخی از تومورها بر اثر جهش‌های جدید نوعی مقاومت درونی (intrinsic resistance) در برابر درمان‌های دارویی ایجاد می‌گردد. ظاهراً یگانه‌گزینه درمان برای این نوع تومورها که به شکل پیش‌رونده یا مهاجم توصیف می‌شوند، کشف داروهای جدید و مناسب می‌باشد (۹، ۱۰).

درمانی اختصاصی علیه انواع سرطان‌ها که به نحو موثری در افراد و تومورها متفاوت است، یاری‌رسان باشد (۴-۶). از سوی دیگر، مسیرهای پیام‌رسانی سلول‌های بنیادی که قویاً توسط سلول‌های سرطانی تقلید می‌شوند، توجه‌ها را به سوی سلول‌های سرطانی بنیادی (cancer stem cells, CSCs) که به عنوان سلول‌های ایجادکننده تومور تلقی می‌شوند، جلب کرده‌اند (۷). تصور بر این است که این سلول‌ها می‌توانند هدف‌های بالقوه‌ای برای داروهای سرطانی باشند، که در ادامه به تفصیل مورد بحث قرار گرفته‌اند.

فارماکوژنومیک و سلول‌های بنیادی سرطانی

مطالعات فارماکوژنومیک و سرطان

در دو دهه اخیر سرطان به عنوان یک فرایند ریزتکاملی مطرح گردیده است. این مفهوم برگرفته از الگوی تصادفی "stochastic model" در پیشرفت سرطان است. با این تصور که سلول‌های درون یک تومور احتمال اکتساب یک جهش انکوژنی (oncogenic) را به نحو یکسان داشته و کلون‌های موفق

اطلاعات در مورد مقاومت دارویی CSCs، مصرف و عملکرد آنها در پزشکی مورد تاکید قرار می‌گیرد.

مقاومت CSCs: واقعیت‌ها و افسانه‌ها

نشانه‌های CSCs

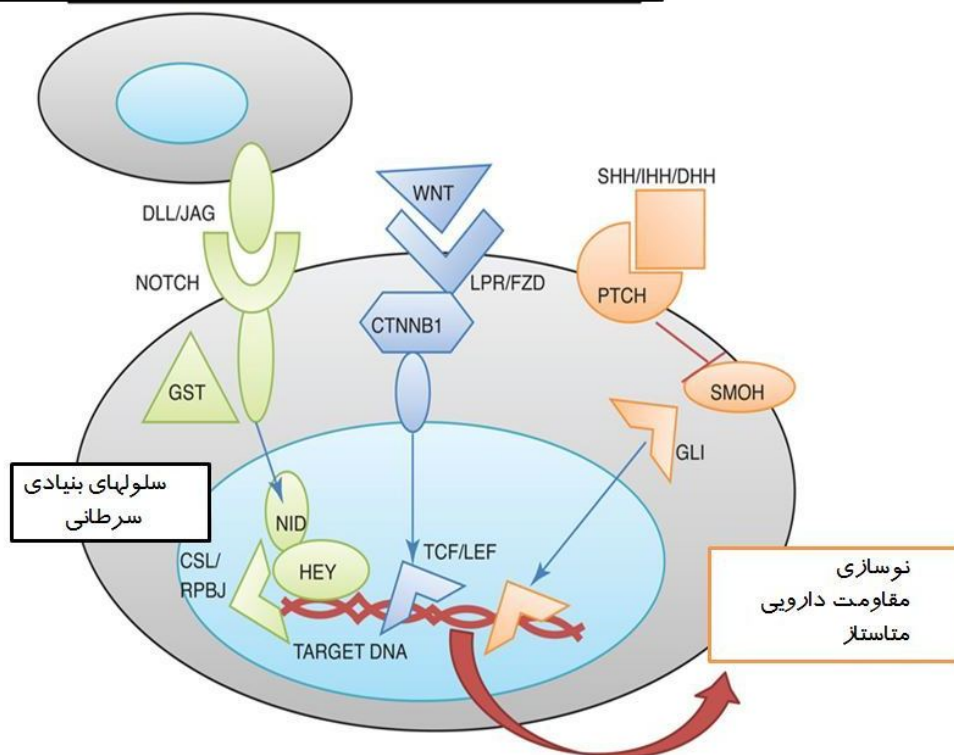
در این مقاله CSCs به عنوان یک جمعیت سلولی قابل تمییز تصور می‌شود که بر اساس نشانه‌های سطح سلولی (برای نمونه CD133)، فعالیت آنزیمی (برای نمونه Aldehyde Dehydrogenase=ALDH) یا ناقل دارویی (برای نمونه ABCG2) شناسایی می‌شوند. CSCs تنها زیرگروه سلولی هستند که با انتقال به موش‌های با سیستم ایمنی ضعیف شده ایجاد تومور می‌کنند و سلول‌های توموری ایجاد شده در واقع رفتار سلول‌های اولیه را تقلید می‌کنند. هم چنین CSCs برداشته شده از زونگرافت (xenografts) موش نیز توانایی ایجاد تومور جدید را دارا هستند، که به آن خود نوسازی (self-renewal) گفته می‌شود (۱۵). افزون بر این، CSCs در تومورهای سفت و لوسمی‌ها شناسایی شده است. چندین آزمایشگاه توانایی جداسازی و تقسیم CSCs را از بافت‌های روده، پروستات و مغز گزارش کرده‌اند. در مجموع فراوانی CSCs حدود ۰/۱ تا ۲۰ درصد بسته به نوع سلول و نوع نشانگر و شرایط تجربی دارد (۷، ۱۶).

روش دیگر شناسایی CSCs، رنگ آمیزی Hoechst-33342 است که توسط سلول‌های به اصطلاح side population (SP) جذب نمی‌شوند. پروتئین ABCG2 را که یک ناقل متصل شونده به ATP است، در سلول بیان می‌کنند که موجب انتقال Hoechst-33342 می‌شود (۱۷). بیان ناقل ABCG2 موجب انتقال چندین داروی آگريز (شامل irinotecan, imatinib و doxorubicin) می‌شود. همراه با ABCG2 سایر خانواده ABCG نیز بیان بالایی را در SPs نشان می‌دهند که این خود موجب مقاومت دارویی بیش‌تر می‌گردد (۱۸). مهم‌تر این‌که هر توموری می‌تواند با مقاومت دارویی متفاوتی داشته باشد. سازوکار دیگر مقاومت دارویی SPs می‌تواند وجود درصد بالایی از سلول‌های غیرتقسیم شونده (non-cycling cells) و افزایش بیان ژن‌های ترمیم کننده DNA باشد (۱۷). باوجود مورد اشاره شده در بالا، مهار کننده ناقل ABC استفاده شده در مطالعات، پاسخ ضعیفی به وضعیت بالینی سرطان داده است. بیش‌تر مطالعات از غیر فعال کننده ABCB1 استفاده کرده‌اند، در صورتی که SPs بیش‌تر پروتئین ABCG2 را بیان می‌کنند (۱۳). رابطه بین CSCs و SPs توسط Patrawala و همکاران مطرح و مورد پرسش قرار

الگوی تصادفی برای پیشگویی در پاسخ به داروهای ضد سرطانی استفاده می‌شود. مطالعات فارماکوژنومیکی برای شناسایی چندشکلی‌های سلول‌های جنسی (germinapolymerisms)، جهش‌های اختصاصی تومورها و الگوهای بیانی متفاوت ژن‌ها که می‌تواند تاثیرگذار در بهبود درمان سرطان باشد، اختصاص داده شده است. نقطه ضعف اصلی در این است که در آنالیز ژنتیکی تومورها، همه سلول‌های موجود در تومور سرطانی از لحاظ ژنتیکی یکسان فرض می‌شوند. مطالعات فارماکوژنومیکی بر اساس الگوی تصادفی با مشکلات و موانعی مواجه می‌باشد که طی آزمون‌هایی برای احراز تائیدیه سازمان غذا و داروی امریکا (USA Food and Drug Administration, FAD) مشخص گردیده است (۴). این مطالعات تنها چندین تفاوت ژنتیکی شایع، شامل thypurinemethyltransferase (TPMT) و uridineglucuronosyl-trasferase isoform 1A1 را در متابولیزه کردن دارو بررسی کرده‌اند که برای پیش بینی خطر افراد برای سمیت ایجاد شده به ترتیب به وسیله thypurines و irinotecan می‌باشد. اگر چه نیاز است که آزمون‌های بالینی در آینده برای اثبات تاثیر این داروها انجام شود (۱۱).

از جمله ایرادهای احتمالی مطالعات فارماکوژنومیکی می‌تواند کم توجهی به تاثیر سلول‌های بنیادی سرطانی باشد. تومورهای سرطانی به صورت سیستم رده بندی توصیف میشوند که CSCs ظاهراً در راس این رده بندی قرار می‌گیرند، زیرا CSCs تنها سلول‌های آغاز کننده تومورهای سرطانی در یک بدخیمی هستند (۷). شایان ذکر است که الگوی تصادفی را نمی‌توان برای همه سرطان‌ها تعمیم داد (۱۲). از نقطه نظر CSCs نیز این الگو قابل قبول نیست، زیرا همه جهش‌های رخ داده در سلول‌های سرطانی بالغ به عمل زیست شناختی تبدیل نمی‌شود. در واقع این سلول‌ها نمی‌توانند رشد در سرطان را تحمل کنند. افزون بر این، تصور می‌شود که CSCs می‌توانند مقاومت دارویی داشته و موجب گسترش سرطان پس از درمان گردند. بنابراین، تعیین الگوی CSCs نیازمند رویکرد جدیدی است که بتواند به هر دو نوع مقاومت دارویی اکتسابی و ذاتی پاسخ‌گو بوده و بتواند موجب تغییر در الگوی کنونی فارماکوژنومیکی شود (شکل ۲) (۱۳). استفاده از یک الگوی جدید در راستای رفع این مشکل مرسوم (یافتن الگوی مناسب برای سرطان) نیاز به شناخت و ارائه ابزار جدید و تعاریفی جدید است، که ممکن است در انتها نتایج غیره منتظره و مفیدی به دست دهد (۱۴). در این مقاله مروری یافته‌های جدید همراه با محدودیت‌های آن مورد بحث قرار گرفته است و با توصیف

سلول های سرطانی تمایز یافته یا سلول های استرومایی مربوط به تومور



شکل ۲- مسیر های مرتبط با CSC. مسیرهای Wnt, Hedgehog و Notch در نوسازی، بقا مقاومت دارویی CSCs نقش دارند. مسیر Notch به وسیله لیگاندهای متصل شونده به سلول (DLL, delta-like; JAG, jagged) فعال می‌شوند. این میان کنش موجب فعال سازی در ایجاد شکاف قلمرو داخل سلولی Notch (Notch intracellular domain =NICD)، به وسیله گاما سکرناز (GST) می‌شود. NID به هسته انتقال یافته و موجب تحریک عامل‌های رونویسی CSL/RBPJ و مهار کننده Hey می‌شود. مولکول Wnt به گیرندهای ویژه متصل شده (LPR, lipoprotein receptor and FZD, frizzled)، و از این رو به تثبیت (CTNNB) β -catenin به وسیله مجموعه Dishevelled (DVL) کمک می‌کند. CTNNB به هسته انتقال یافته و منجر به فعال سازی CSL/RBPJ TF می‌شود. مولکول Hedgehog به گیرنده PTCH متصل شده و منجر به غیرفعال کردن Smoothed (SMOH) گردد و از این رو، اجازه تثبیت عامل رونویسی GLI و هم‌چنین انتقال‌های بعدی را به هسته می‌دهد (۴۵).

مقاوم به داروی gemcitabine در سلول‌های پانکراس، نشانگرهای CD44، CD24 و آنتی ژن اختصاصی اپتلیال (epithelial-specific antigen, ESA) را عرضه کرده‌اند که سه نشانگر مهم CSCs هستند و در آنها مسیر فعال سازی سلول‌های بنیادی مشاهده شده است (۲۱). سازوکار دیگر مقاومت دارویی مربوط به CSCs تولید عامل‌های آنژیوژنیک (angiogenic) و سیتوکین‌هایی است که موجب فعال کردن سیگنال‌های جلوگیری کننده از مرگ سلولی برنامه ریزی شده وابسته به STAT3 و STAT5 می‌باشد (۲۲).

عود مکرر پس از شیمی درمانی در الگوی موشی تعمیم شده با CSCs مشاهده شده است (۲۳). Yu و همکاران افزایش تفاوت CD44+/24- را در تومور سرطان پستان پس از شیمی

گرفته است (۱۹). تصور بر این است که تومورزایی بالای SPS غیر وابسته به ABCG2 است. افزون بر این، CSCs بخشی از سلول‌های غیر SPS را شامل می‌شوند. در برخی از تومورها CSCs و SPS کاملاً از هم قابل تمییز هستند. به اختصار، اگر چه SPS در شماری از سرطان‌ها با CSCs و مقاومت دارویی همراهی دارند، درجه تطابق بین این دو جمعیت سلولی هنوز مشخص نیست. این امکان وجود دارد که، بسته به نوع سرطان و شرایط تجربی SPS دارای درصد متغیری از CSCs باشند (۲۰).

راه جایگزین دیگر برای شناسایی SPS، انتخاب کلون‌های مقاوم به داروها (drug resistant clones, DRCs) و نیز چک کردن ویژگی CSCs در این سلول‌ها است. برای نمونه، کلون

مسیر Wnt یک الگوی زیستی حفاظت شده است که به شکل علامت‌دهی پاراکرینی (paracrine signaling) عمل می‌کند و به‌طور عمده در مسیر تکاملی و تکوینی فعال است. در ارگانیس‌های بالغ، مولکول‌های Wnt سرنوشت سلول‌های بنیادی چند توانی (multipotent stem cells) را در تبارهای متفاوت تنظیم می‌کنند (۳۳). تحریک نامناسب Wnt موجب افزایش تومور زایی در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی می‌گردد.

نمونه معروف از این تحریک‌های نامناسب، جهش غیرفعال کننده ژن APC است که موجب افزایش ایجاد سرطان روده می‌گردد (۳۴). جهش در سایر اجزای مسیر شامل β -catenin نیز در سایر تومورها از جمله پوست، کبد، پروستات و تخمدان شناسایی شده است. نقش جهش در اجزاء مسیر Wnt در CSCs شبیه به نقش آن در سلول‌های بنیادی سوماتیکی طبیعی است. در کولون و ریه، مسیر Wnt یک نیاز اساسی برای نگه داشتن استخر سلول‌های بنیادی است. بنابراین جهش فعال کننده این مسیر موجب ایجاد تومورزایی می‌گردد (۳۵).

شایان تاکید است که در سلول‌های سرطانی مقاوم به شیمی درمانی بیان چندین بازدارنده مسیر Wnt (شامل Wnt Inhibiting Factor= WIF1, Secreted Frizzled Related Protein= SFRP, Dickkopf-1 = DKK1) کاهش می‌یابد. DKK1 موجب حساسیت سلول‌های سرطانی به مرگ سلولی ایجاد شده توسط مواد الکیله کننده می‌شود (۳۶). افزون بر این، WIF1 موجب افزایش حساسیت شیمیایی به paclitaxel and etoposide در سلول‌های سرطانی پروستات می‌گردد (۳۷).

مسیر Hedgehog یک مسیر مهم تکوینی جنینی است که در بزرگسالی فعالیت آن تنها به ترمیم و زنده نگه داشتن بافتی، تقلیل می‌یابد. فعال سازی نامناسب آن به سرطان‌های متفاوت انسان ربط داده شده است (۶، ۳۸).

چندین گروه مطالعاتی مسیر Hedgehog را بر حفظ CSCs ربط داده‌اند. برای نمونه Liu و همکاران نشان داده‌اند که مسیر Hedgehog نقش مهمی در حفظ مقدار نسبت سلول‌های CD44+CD24- به ریز جمعیت سلول‌های سرطانی پستان (CD44+CD24-/low subpopulation of breast cancer) با تنظیم ژن BMI-1 ایفا می‌کند (۳۹). افزایش فعالیت مسیر Hedgehog در سلول CD133+ گرفته شده از سلول‌های متاستازی در مقایسه با غیر متاستازی مشاهده شده است. در افراد با سرطان کولون اولیه افزایش حدود ۷-۸ برابری

درمانی نشان داده‌اند (۲۴). در صورت تعمیم این مشاهدات به دیگر سرطان‌ها می‌توان به الگویی دست یافت که شیمی درمانی CSCs را انتخاب می‌کند.

مسیر مربوط به CSCs، نوسازی و ورای آن

ویژگی‌های CSCs به وسیله مسیرهای اطلاع رسانی مهم رشد شناخته می‌شوند که هر یک شامل دسته‌ای ویژه‌ای از ژن‌ها است. مهم‌ترین مسیرهای پیام رسانی که موجب نوسازی این سلول‌ها می‌شوند شامل مسیرهای Wnt، Notch و Hedgehog هستند که از لیگاند‌های برون سلولی اختصاصی، گیرنده‌های سطح سلولی، مسیرهای انتقال پیام درون سلولی تشکیل شده‌اند که در نهایت موجب فعال شدن عامل‌های رونویسی که مسئول بیان بسیاری از ژن‌های ضروری هستند، می‌گردد (شکل ۲) (۲۵). مشاهدات حاکی از آن است که مسیر ویژه هر CSCs به مقاومت دارویی آن سلول‌ها مربوط است (۲۶).

مسیر Notch نقش مهمی را در سرنوشت سلولی، تقسیم سلولی و ادامه حیات آن در بسیاری از ارگانیس‌ها دارد. یک ویژگی مهم این مسیر، توانایی آنزیم γ -secretase در چسبیدن به قلمرو درون سلولی (Notch Intracellular Domain NID) است که سپس به درون هسته منتقل می‌شود و در نهایت موجب ایجاد تحریک بیان ژن یا خاموش سازی آن می‌گردد. پیام رسانی نامناسب در مسیر Notch موجب ایجاد اختلالات وسیعی در انسان از جمله اختلالات تکوینی و سرطان می‌شود (۲۵). شبکه Notch در سلول‌های بنیادی بالغ طبیعی در تقسیم سلولی و سرنوشت سلولی نقش دارد (۲۷). اگر چه نقطه مقابل این مشاهدات نیز گزارش شده است، که در آن ژن‌های Notch به عنوان انکوژن و بازدارنده تومور در چندین سرطان مشاهده شده است و چنین فرض شده است که عملکرد متفاوتی از این ژن‌ها در درون سلول‌های طبیعی وجود دارد (۲۸). گزارش‌های متعددی از فعال شدن مسیر Notch در CSC چندین بافت متفاوت طبیعی وجود دارد (۲۹). به وسیله فعالیت مسیر جلوگیری از مرگ سلولی، مسیر Notch در CSCs می‌تواند مقاومت دارویی ایجاد کند. برای نمونه، γ -secretase در مسیر Notch موجب تحریک فسفریلاسیون Akt می‌شود (۳۰)، که سازوکاری برای گریز از مرگ سلولی پس از شیمی درمانی است (شکل ۲). با توجه به این مشاهدات متوقف سازی آنزیم γ -secretase موجب بهبود درمان سرطان روده می‌گردد (۳۱)، هم‌چنین مهار Notch3 موجب بهبود عملکرد داروی doxorubicin بر روی سلول‌های سرطانی هپاتوسلولار می‌شود (۵، ۳۲).

آگهی (prognostic) و عامل های پیش گوینده (predictive) را داشته باشد که این مهم نیازمند مقایسه افراد درمان شده با شیوه درمانی ویژه است.

در واقع یک نشانگر پیش گوینده واقعی مربوط به نتایج درمانی حاصل از افراد درمان شده با یک شیوه درمانی ویژه انتخاب شده می باشد (۵۲). جدول ۱ خلاصه ای از مطالعات پیشنهاد کننده ژن ها و مسیرهای پیشگویی کننده قوی CSCs را ارائه می دهد. این مطالعات بر اساس میزان بیان در بافت های سرطانی است. شماری مطالعات نشانگرهای CSC را به عنوان پیشنهاد کننده بهبود ضعیف یا کاهش نجات بیماران درمان شده با یک شیوه ویژه شناسایی کرده اند (۵۳-۵۶). جالب توجه این که در یک مطالعه ای رابطه بین نجات یافتن از بیماری و بیان CD133 پس از انجام عملیات پیش از درمان (neoadjuvant therapy) در سرطان مقعدی نشان داده است. افزایش بیان CD133 با بهبود یافتگی کمتر و افزایش عود مکرر همراهی نشان داده است (۵۷). گرچه این مطالعه فاقد گروه کنترل (که درمان روی آنها انجام نگرفته باشد) می باشد، اما پیشنهاد کننده نقش فعال این گروه در مقاومت دارویی در درمان بیماران است. در دو مطالعه، یافته هایی حاکی از رابطه نزدیکی بین عود دوباره تومور و فعال سازی مسیرهای Hedgehog و یا Wnt پس از درمان می باشد (۵۸، ۵۹). در نهایت بیان CD133 در non-small cell lung cancer (NSCLC) با بیان ژن های مقاومت دارویی مرتبط است (۶۰). با توجه به مطالعات انجام شده، این مقاومت دارویی در سلول های CD133 می تواند به دلیل افزایش بیان Akt/PKB, Bcl-2, ABCB1, ABCG2 باشد (۶۱، ۶۲). بنابراین، این امکان منتفی نیست که نیم رخ های بیان ژنی مسیرهای مربوط به CSCs ابزار مناسبی برای مطالعات فارماکوژنومیکی آینده باشد. یک رویه سنتی برای استفاده از آنالیز فارماکوژنومیک، ارتباط دادن واریانت های ژنتیکی در پاسخ به درمان ها است (۶۳). چندشکلی های سلول های زایشی و جهش های اکتسابی سوماتیکی هر دو می توانند در مقاومت دارویی تاثیر داشته باشند، رخدادی که آشکار کننده یک نشانگر است. چنانچه پیش تر تصریح شد، مسیرهای Notch, Hedgehog, Wnt هر سه در مقاومت دارویی و مسیرهای نو سازی CSCs نقش دارند. جالب این که این مسیرها توسط مولکول های کوچک جدیدی متوقف می شوند. برای نمونه مهار کننده گاماسکرتاز- γ secretase inhibitors (GSIs) می تواند در مسیر پیام رسانی Notch دچار اختلال شده و در نتیجه موجب نو سازی CSCs در چندین نوع تومور گردد (۶۴). با وجود این سمیت معدی شکمی داروی GSIs، این دارو در حال حاضر در مرحله ۲

سلولهای CD133+ نسبت به افراد طبیعی مشاهده شده است (۴۰). CSCs مغزی نیز برای تقسیم، زنده ماندن، نو سازی و تومورزایی وابسته به مسیر Hedgehog است، به این نحو که با افزایش فعال سازی مسیر Hedgehog که در نهایت موجب فعال سازی بیش تر GLI1 و GLI2 گشته و ایجاد تومورزایی می کند (۴۳-۴۱).

فعال سازی مسیر BMI-1 توسط مسیر Hedgehog اصلی ترین سازوکار مقاومت دارویی در برخی از سرطان ها است. در کارسینوم نازو فارنژیال (nasopharyngeal carcinoma) و سرطان پروستات، غیر فعال سازی BMI-1 نقشی در نجات سلولی ندارد، اگر چه مرگ سلول ایجاد شده توسط سیستم درمانی را به نحو مناسب بهبود می بخشد (۴۴، ۴۵).

در نتیجه، بر اساس مشاهدات، مسیرهای سیگنالی عمده که نو سازی و تمایزی را در سلول های بنیادی طبیعی نقش دارند، به شکل گسترده ای در زیست شناسی CSCs نیز ایفای نقش می کنند. هم چنین نقش آنها در بسیاری از سرطان ها مشخص گردیده و پیشنهاد شده است که ردیابی این مسیرها می تواند یک راهکار کلیدی و مهمی را برای حفظ و از بین بردن CSCs به شمار آید (۲۶).

مطالعات فارماکوژنومیکی CSCs

الگوی اصلی بر این ایده استوار است که CSCs آغاز کننده تومور، نسبت به سایر سلول های سرطانی مهاجم تر و مقاوم تر به شیمی درمانی هستند. این ایده در حالی است که مشاهدات بالینی، این نظریه را که هنوز به طور کامل اثبات نگردیده است، با پرسش های جدی مشتمل بر موارد زیر به چالش طلبیده است: ۱- آیا CSCs می توانند به راحتی موجب تومور زایی در موش های با سیستم ایمنی ضعیف شده، شوند؟ (۴۶)، ۲- آیا مقاومت دارویی CSCs به وضعیت و موقعیت کشت بافت و داروهای مصرفی بستگی دارد؟ (۴۷) تحقیقاً، پاسخ این پرسش های مهم، نیازمند پژوهش های تکمیلی است که در آن مشاهدات بالینی باید نشان دهند که CSCs در تومورهای بسیار بدخیم و مهاجم فعال می شوند و پاسخ مناسبی به شیمی درمانی نمی دهند.

بیان CD133 پیشنهاد کننده نجات یافتن و زنده ماندن بیمار در سرطان های روده و مغزی- نخاعی است (۴۸، ۴۹). در حالی که بیان CD44 در رابطه با خطر متاستاز در سرطان معده و پستان است (۵۰، ۵۱). به دلیل وجود برخی نشانگرهای مسیرهایی برای پیشگویی CSCs، مطالعات فارماکوژنومیکی آینده باید توانایی تمییز بین عامل های پیش

لیگاند ظهور می‌یابد. تغییرات ژنتیکی غیر معمول، بیش‌تر قلمروهای برون سلولی را متاثر کرده و یا موجب افزایش فعالیت γ -secretase می‌شود. با توجه پیشینه ژنتیکی انتظار زیادی بر موثر بودن GSI در درمان T-ALL وجود دارد. متأسفانه، مرحله اولیه آزمون‌های بالینی بر روی GSI در درمان T-ALL نتایج نامید کننده‌ای مشتعل بر پاسخ دهی بسیار ضعیف و مسمومیت‌زای معدی شکمی را به همراه داشته است. این نتایج نشان دهنده اهمیت مطالعات فارماکونومیک در مرحله اولیه ارائه داروهای علیه CSCs می‌باشد (۶۷). با توجه به ماهیت اختصاصی این داروها، ضروری است که با شناسایی نشانگرهای مولکولی ویژه بتوان بیمارها را به شکل اختصاصی انتخاب کرده و بهبود بخشید. در این مورد می‌توان بر این تصور بود که تنها شماری از جهش‌ها (غیر وابسته لیگاند) به GSI حساس می‌باشند. دیگر جهش‌ها (واجد حساسیت‌زایی بالا به لیگاند) شاید بهترین گزینه برای رویکردهای تکمیلی (برای نمونه، آنتی بادی اختصاصی Notch-1) باشند. فعال شدن مسیر پیام رسانی

آزمایش بالینی برای سرطان ملانوم بدخیم و پانکراس استفاده می‌شود. این مطالعات موجب شده است که GSI از جمله نخستین داروهای مورد استفاده علیه CSCs در مرحله آزمایش بالینی به شمار آید. در صورتی که اثر این دارو در آزمون‌های بالینی مثبت اعلام گردد، واریانت‌های ژنتیکی موجود در مسیر Notch می‌تواند در پیش گویی عملکرد ضد توموری GSI یا عوارض جانبی آن کمک کننده باشند (۶۵, ۶۶). برای تایید این اصل، پژوهشگران واریانت‌های ژنتیکی معمول در ژن‌های مسیر Notch را که می‌توانند در نوسازی CSCs و حساسیت به GSI نقش داشته باشند، مورد مطالعه قرار دادند. جدول ۲ نشان دهنده مهم‌ترین جهش‌های ژنتیکی سلول‌های سوماتیکی و چندشکلی‌های گزارش شده در سرطان می‌باشد. ژن Notch1 تقریباً در ۶۰ درصد لوسمی لنفوئید سلول‌های T-cell acute lymphoid leukemias (T-ALL) جهش دارد. بیش‌تر تغییرات به شکل جهش‌های بدمعنی یا حذف‌ها و درج‌های کوتاه است که نتایج آن به صورت فعال شدن بدون نیاز به لیگاند Notch یا افزایش فعالیت در اثر

جدول ۱- مطالعات بالینی نشان دهنده ارتباط بین مسیر مربوط به CSC و پاسخ به درمان

ژن	گوناگونی	عملکرد	نرخ	Ref.
NOTCH1	جهش	فعال سازی (T-ALL)	٪۶۰	(۶۷)
NOTCH1	جهش	پاسخ به GSI و پیش آگهی (NSCLC)	٪۱۲	(۶۸)
NOTCH2	جهش	نامعلوم (سرطان پستان)	٪۲/۱	(۷۰)
NOTCH3	جهش	نامعلوم (سرطان کولورکتال)	٪۲	(۷۰)
NOTCH3	Amplification (تشدید)	پاسخ به GSI (سرطان تخمدان)	٪۱۹/۵	(۶۹)
NOTCH2	SNP	افزایش خطر ابتلا به سرطان (سرطان پستان)	٪۱۶/۵	(۷۱)
HEY1	SNP	پاسخ به فعال کننده P ⁵³	٪۱	(۷۲)

جدول ۲- تغییرات ژنتیکی شایع در ژن مسیر notch

ژن	گوناگونی	عملکرد	نرخ	Ref.
NOTCH1	جهش	فعال سازی (T-ALL)	٪۶۰	(۶۷)
NOTCH1	جهش	پاسخ به GSI و پیش آگهی (NSCLC)	٪۱۲	(۶۸)
NOTCH2	جهش	نامعلوم (سرطان پستان)	٪۲/۱	(۷۰)
NOTCH3	جهش	نامعلوم (سرطان کولورکتال)	٪۲	(۷۰)
NOTCH3	Amplification (تشدید)	پاسخ به GSI (سرطان تخمدان)	٪۱۹/۵	(۶۹)
NOTCH2	SNP	افزایش خطر ابتلا به سرطان (سرطان پستان)	٪۱۶/۵	(۷۱)
HEY1	SNP	پاسخ به فعال کننده P ⁵³	٪۱	(۷۲)

هر دو چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) و تغییرات سوماتیکی (تشدید ژنی و جهش ژنی) بر رفتار سلول سرطانی تاثیر گذار است. نرخ، به میزان جهش در نمونه‌های سرطان، و یا فراوانی آلل جزئی در سفیدپوستان (SNP) اشاره دارد. T-ALL: T-cell acute lymphoid leukemia; NSCLC: non-small cell lung cancer; GSI, γ -secretase inhibitor

قرار گیرند (۷۳). برای شناسایی این سلول ها آنالیزهای چند پارامتری (Multiparametric analysis) و حساسیت بالا ضروری است. به دلیل این که CSCs اغلب به وسیله چندین نشانگر شناخته می شوند و نیز میزان آن ها به اندازه ۱ در ۱۰۰۰ می باشد. تصویر برداری چشمی با کیفیت بالا (High resolution optical imaging) برای نتوپلاسم سطحی (برای نمونه سرطان پستان) با توجه بر محدودیت های نفوذ پذیری، یکی از بهترین گزینه ها به شمار می آید. ام آر ای (Magnetic Resonance Imaging) و پوزیترون ایمیشن توموگرافی (PET) برای تصویربرداری از نتوپلاسم درونی مناسب می باشد، هر دو روش به پروب های ردیابی رادیویی یا نشانگرهای ویژه نیاز دارند که به صورت غیر یکسان CSCs را ردیابی کنند. ابزارهای شبیه بر روی الگوهای حیوانی استفاده شده است (۷۴). بنابراین مطالعات آینده باید خاصیت فارماکوکنتیکی و فارماکوژنومیک پروب های CSCs (برای نمونه radiolabeled anti-CD133 antibodies را بررسی نماید.

رویکرد دیگر، جدا کردن CSCs از خون محیطی است، روشی که می تواند به سرعت در بالین مورد استفاده قرار گیرد (۷۵). سلول های توموری در حال گردش (Circulating tumor cells) (CTCs) به میزان یک در هر میلیون سلول در خون بیمار متاستازی مشاهده می شود. در سلول های سرطانی پخش شده (Disseminated tumor cells) (DTCs) نیز می تواند به عنوان سلول های میکرومتاستاز در مغز استخوان شناسایی گردند. به دلیل این که CTC/DTCs و CSCs ویژگی های مشترکی را از خود بروز می دهند، پژوهش هایی درباره وجود سلول های آغاز کننده تومور در خون و مغز استخوان افراد سرطانی را انجام گرفته است. Balic و همکاران مطالعه ای را بر روی نمونه بیوپسی مغز استخوان بیمار با سرطان پستان که برای CD24 and CD44, (CK) cytokeratin علامت گذاری ایمنی شده بودند انجام دادند (۷۶). سلول های CD44+/24-CSCs، با میزان ۷۲ درصد در همه ی نمونه های بیوپسی مشاهده شده است که بسیار بیش تر از تومورهای اولیه اند. نتایج مشابه نیز به وسیله CTCs از بیماران با سرطان پستان گزارش شده است (۷۷). این اطلاعات به نظریه خاصیت فرار CSCs از تومور اولیه و ایجاد میکرومتاستازها در بافت های دورتر قوت می بخشد.

هم چنین اطلاعات به دست آمده از بیماران سرطان پستان حاکی از جالب بودن CSCs به عنوان یک هدف در مطالعات فارماکوژنومیک است. افزایش میزان CTC پیش و پس از شیمی درمانی پیشنهاد کننده کوتاه بودن امید به به زندگی

Notch نیز تقریباً در ۳۰ درصد NSCLC مشاهده شده است که به خاموش سازی مهار کننده مسیر یا جهش در Notch-1 که موجب فعالیت غیر وابسته به لیگاند می شود، نسبت داده می شود (۶۸). شایان ذکر است که سلول های گرفته شده از سرطان های با افزایش پیام رسانی در مسیر Notch حساسیت بالایی به GSI نشان می دهد. شاید به دلیل نقش اساسی γ -secretase در تکامل رسپتورهای مسیر Notch-1 باشد، که GSI موجب بلوکه شدن این مسیر می شود. افزون بر این، با فعال شدن مسیر Notch میزان نجات یافتن و بهبودی ضعیفی پیش بینی می شود. به طور مشابه، افزایش ژن Notch-3 در سرطان تخمدان با درجه بالا نیز حساسیت بالایی به GSI نشان می دهد (۶۹).

در برخی تومورهای سفت مانند پستان و روده، جهش در ژن Notch یا γ -secretase رایج نیست، بنابراین کارکرد و تاثیر GSI را زیر سوال می برد (۷۰، ۷۱). در این گونه موارد ممکن است فعال سازی مسیر Notch به وسیله مولکول های پایین دست مسیر انجام شود. برای نمونه، فعالیت عامل هسته ای وابسته Notch به وسیله یک SNP غیر هم نام Hey1 (Hey hairy/enhancer-split related with YRPW) یک مهار کننده رونویسی است که توسط NID فعال می شود که به شکل کلی به عنوان تنظیم کننده مثبت ژن بازدارنده تومور p53 عمل می کند. جایگزینی لوسین-متیونین می تواند فعال شدن p53 را دچار اختلال کند و سرانجام تقسیم سلولی نامناسب را تسهیل کند. هم چنین آلل های متفاوت به فعالیت داروهای پرو آپتوتیک با هدف p53 حساس نیستند.

در نتیجه، آنالیز کامل پیرامون تفاوت های ژنتیکی سلول های سوماتیکی و سلول های زایشی در مسیرهای وابسته به CSCs می تواند به درمان های مختص فرد (هدفمند) کمک کند. اگر چه به دلیل این که CSCs تنها درصد کمی از سلول های متعلق به بیش تر تومورها را تشکیل می دهند، آنالیز ژنتیکی این سلول ها باید به وسیله سیستم های تجربی کاملاً جدیدی بهبود یابند که در ادامه، مورد بحث قرار گرفته است.

دیدگاهی نو برای CSCs

برای انجام یک مطالعه جدید فارماکوژنتیکی به رویکردهای موثر برای پیگیری تغییرات CSCs در پاسخ به داروهای ضد سرطانی نیاز است. هم چنین راهکارهایی برای شناسایی و افتراق CSCs از بیماران لازم می باشد. برای نمونه فنون تصویر برداری می توانند برای شناسایی CSCs مورد استفاده

می‌تواند پاسخگوی دلیل افزایش نجات و بهبودی در بیماران باشد، می‌گردد. اگر چه که میزان CSCs پس از شیمی درمانی متاسفانه می‌تواند حتی افزایش یابد، بنابراین احتمال عود دوباره دیر هنگام و متاستاز را افزایش می‌دهد (۲۴، ۸۳).

برای ایجاد یک مطالعه فارماکوژنومیک بر اساس CSCs نیاز به فن‌آوری‌های نوین است که بتوانند میزان CSCs را *in vivo* نشان دهند. چنان چه پیش‌تر بحث شد سی تی اسکن با دقت بالا و MRI ابزارهای نیرومندی هستند. مهم‌ترین مشکل پیش روی، ایجاد پروب‌های ویژه CSCs است. به این دلیل که هنوز نشانگرهای بسیار اختصاصی برای این سلول‌ها گزارش نشده است و از سویی دیگر قابل توجه است که بدانیم هنوز برای شماری از تومورهای سفت، فنوتیپ مربوط CSCs به طور دقیق گزارش نشده است. افزون بر این‌ها پروب‌ها نباید از سمیت برخوردار باشند و بتواند به شکل گسترده به سلول‌ها در درون توده توموری منتشر گردند.

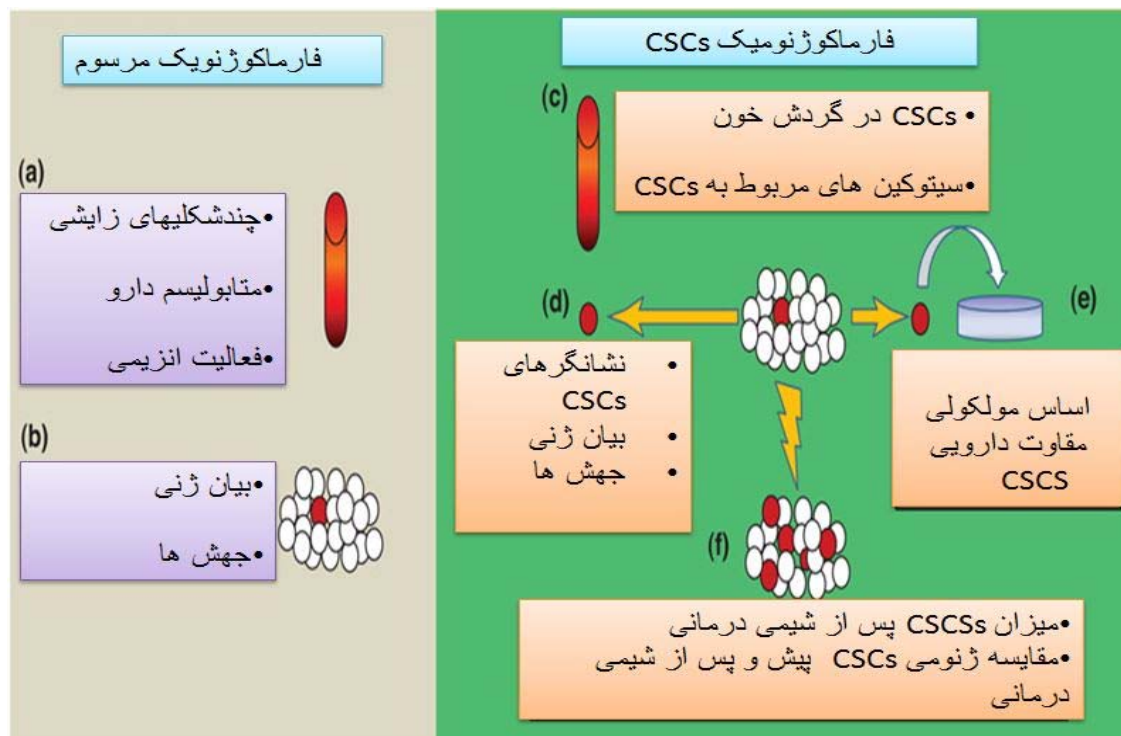
به دلیل این‌که هیچ یک از این روش‌ها هنوز در سطح بالینی مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند، نشانگرهای جانشین برای فعالیت CSCs در آینده نزدیک مورد نیاز است. یک نشانگر جانشین برای فعالیت CSCs می‌تواند عامل‌های محلول شامل سیتوکین‌های متفاوت باشد. مطالعات نشان داده است که مبتلایان به سرطان‌های متفاوت، افزایش در میزان سیتوکین‌های متفاوتی به‌ویژه اینترلوکین ۶ (IL6) را نشان می‌دهند. سیتوکین‌های تولید شده به وسیله استرومای مربوط به تومور و سلول‌های سرطانی مسؤول برخی از علائم مربوط سرطان مانند فرسودگی طولانی مدت و اختلال شناختی می‌باشد (۸۴). میزان زیاد IL6 یک عامل غیر وابسته نشان دهنده بقای کوتاه مدت در برخی از تومورها از جمله سرطان پستان است (۸۵، ۸۶). Mammospheres جدا شده از بیماران سرطان پستان میزان زیادی IL6 تولید می‌کنند. با متوقف کردن این لوپ اتوکرینی، مسیر رشد CSCs و تهاجمی بودن مختل می‌شود (۸۷). به دلیل ارتباط بین میزان IL6 و پیش‌آگهی سرطان پستان و نیز زیست‌شناسی CSCs، به نظر می‌رسد میزان IL6 می‌تواند به عنوان یک نشانگر در فعالیت anti_CSCs لحاظ گردد.

چنان‌چه در شکل ۳ نشان داده شده است، نظریه CSC تاثیر گسترده‌تری در مطالعات فارماکوژنومیک خواهد داشت. به صورت معمول مطالعات مرسوم فارماکوژنومیک با جهش‌ها و تغییرات سلول‌های سوماتیکی و جنینی سر و کار دارد (۶۳، ۸۸). در مرحله نخست چندشکلی‌های موجود در سلول‌های طبیعی و سرطانی معمولاً از طریق نمونه‌هایی با دسترسی

بدون درگیری به بیماری (disease-free survival) است (۷۸). DTCs از هر دو روش شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی می‌تواند گریخته و زنده باقی بمانند و چندین سال پس از جراحی تومور در مغز استخوان مشاهده شوند و بدین ترتیب امکان متاستاز دیر هنگام را افزایش دهند (۷۹). در صورت درستی نظریه CSCs، میزان CSCs درون CTC و DTC باید به عنوان یک معیار مناسب و دقیق برای پیش‌بینی و درمان و نجات پس از شیمی‌درمانی لحاظ گردد. در نتیجه، تصویر برداری با قدرت بالا و جداسازی CTC/DTC می‌تواند برای شناسایی CSCs در مطالعات فارماکوژنومیک استفاده شوند. نقطه ضعف اصلی در این موضوع میزان بسیار کم CSCs است. این امر موجب ایجاد یک نتیجه منفی کاذب در صورت عدم حساسیت کافی آزمون‌ها یا ایجاد یک نتیجه مثبت کاذب در صورت وجود علامت‌رسانی افزایش یافته خواهد شد. هم‌چنین داده‌ها نیز باید قابل تکرار و دست‌یافتنی بوده و آنالیز بر اساس زمان (time-course analysis) بر روی CSCs پیش و پس از شیمی‌درمانی، نیز قابل انجام باشد.

طراحی مطالعه‌های فارماکوژنومیک نوین

تاثیر عملکرد مرسوم داروهای ضد سرطانی بر این اساس که همه سلول‌های سرطانی به یک میزان خطرناک هستند، اندازه‌گیری می‌شوند. فعالیت ضد سرطانی به وسیله معیارهای ارزیابی پاسخ به تومورهای سفت Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) اندازه‌گیری می‌شوند (۸۰). معیارهای تخمین حجم تومور پس از درمان را به وسیله MRI و سی تی اسکن ارزیابی می‌کند. اگر چه اندازه‌گیری‌های بر اساس حجم هنگامی که فعالیت زیستی یک دارو اندازه‌گیری می‌شود می‌تواند گمراه‌کننده باشد (۸۱). از نقطه نظر الگوی CSCs نیز نامناسب می‌باشد. دلیل این امر آن است که CSCs تنها می‌تواند ۰/۱ درصد از کل حجم را تشکیل دهند (۸۲). داروهای ضدسرطانی که تنها علیه سلول‌های غیر CSC تولید می‌شوند، فقط می‌تواند موجب کوچک شدن اندازه تومور شوند که سودمندی اندک یا هیچ را برای بهبود بیماری خواهد داشت. به دلیل این‌که این سلول‌های توانایی تقسیم نداشته یا تنها توانایی بسیار محدودی دارند و دلیل اصلی بزرگ شدگی اندازه تومور نیستند. بر اساس شواهد و اطلاعات پیش‌بالینی (pre-clinical) و فارماکوکنتیک به نظر می‌رسد شیمی‌درمانی‌هایی که هر دوی CSCs و non CSCs را مورد هدف قرار می‌دهند، از ویژگی به مراتب بالاتری برای جمعیت اولیه برخوردار هستند که ظاهراً موجب کاهش تعداد CSCs که



شکل ۳- طراحی مطالعات نوآورانه فارماکوژنومیکی. مطالعات فارماکوژنومیکی مرسوم به آنالیز بر روی نمونه خون (a) و یا بر روی نمونه بافت سرطانی (b) می پردازد. در مورد اول، چند شکلی های زایشی و متابولیسم دارو مطالعه شده است که سمیت مربوط به شیمی درمانی پیش بینی شود. در مورد دوم، آنالیز ژنومیک بر روی جمعیت سلولی مختلط انجام می شود، که معمولاً شامل درصد کمی از CSCs (سلول به رنگ قرمز) می باشند. فارماکوژنومیک CSCs باید شامل توانایی شناسایی CSCs در گردش و اندازه گیری سیتوکین مربوط به CSCs در گردش خون باشد (c). همچنین CSCs جدا شده از تومورهای اولیه (d) برای آنالیز ویژه ژنومی و پروتومیک مناسب است. همچنین می توان CSCs را به صورت *in vitro* به منظور آزمون حساسیت به دارو گسترش داد (e). در نهایت، اگر CSCs بسیار مقاوم باشند، شیمی درمانی موجب افزایش درصد آنها در تومور خواهد شد. بنابراین آنالیز میزان CSCs پس از *neoadjuvant chemotherapy* و همچنین مقایسه ژنومی CSCs پیش و پس از شیمی درمانی می تواند پاسخ بیماران به درمان را پیش بینی کند (۱۳).

علیه نشانگرهای CSCs در نمونه های ریز برش استفاده کرد که توانایی ایجاد نیم رخ ژنتیکی ویژه CSCs را ارائه دهند. اگر چه به نظر می رسد که مشکل اصلی پراکندگی بسیار کم CSCs است. با این وجود، فن آوری های جدید می تواند به شکل مناسبی تنها یک سلول را جدا کند (۹۰). روش جایگزین دیگر برای مطالعه مقاومت دارویی CSCs، تکثیر آزمایشگاهی است. به این دلیل که LMD نیاز به تثبیت کردن بافت دارد، برای این منظور مناسب نیست. CSCs معمولاً شکل کروی را در محیط کشت سلول های بنیادی به خود می گیرند و چندین نشانگر CSC را عرضه و بیان می کنند. با استفاده از این فن CSCs از تومورهای پستان، مغز و پروستات جدا سازی و تکثیر شده اند (۹۳-۹۱). محتویات محیط کشت سلول های بنیادی از بافتی به بافت دیگر متفاوت می باشد. با این تفاوت های ویژه رشد سلول های طبیعی و

آسان که معمولاً خون می باشد بررسی می گردد، ثابت گردیده این راهکار در کشف واریانت های ژنتیکی موثر در متابولیسم دارو کار آمد است. در مرحله دوم، جهش های ویژه سلول های سرطانی و نیز الگوی بیانی در سلول های سرطانی به وسیله نمونه بیوپسی گرفته شده از تومور بررسی می گردد. برای نمونه جهش EGFR به حساسیت *non-smallcell lung cancer* در مقابل gefitinib ربط داده شده است (۶۳). چنانچه CSCs به تنهایی پیشرفت سرطان و مقاومت دارویی را موجب می شوند، انجام نمونه برداری به صورت دقیق ضروری است. نمونه های ریز برش لیزری *microdissection Laser* (LMD) از بافت برای مطالعات فارماکوژنومیکی که نیم رخ ژنتیکی در آن بررسی می شود ارائه شده است (۸۹)، با یک تعدیل مناسب می توان به وسیله LMD، CSCs را به صورت سطحی از تومور جدا کرد. آنتی بادی هایی را می توان

ظاهرا تعریف مناسبی از نحوه گسترش سرطان ارائه می‌دهد و هم چنین می‌تواند تا حدودی پاسخ‌گوی علل چالش‌های درمانی از جمله مقاوت دارویی باشد. مسیرهای مربوط به سلول‌های بنیادی که توسط CSCها به نحو گسترده تقلید می‌شوند زمینه گسترده‌ای را برای دانش فارماکوژنومیک در ارتباط با مطالعات سرطانی به جود آورده است. با این دانش راهبردی می‌توان به بررسی گوناگونی‌های ژنتیکی در هر دوی سلول‌های سوماتیکی و زایشی و ارتباط آن با پاسخ‌های درمانی متفاوت افراد پرداخت. از جمله چالش‌های پیش روی این مسیر، شناسایی CSCها به دلیل وجود مقادیر بسیار کم آنها در بین سلول‌های توموری است. طراحی راهکارهای مناسب و ابزارهایی با قدرت بالا در شناخت این سلول‌ها امری ضروری است. از سویی دیگر برای دست یابی به این هدف‌های یک همکاری بسیار گسترده و نظامندی بین زیست‌شناسان و به ویژه در قلمرو CSC و پزشکان متخصص سرطان یک نیاز اساسی است، تا در نهایت یک تحول عظیم در درمان سرطان به شکل اختصاصی و انفرادی به وجود آید.

CSCs امکان‌پذیر است (۹۴). این که یک نیم‌رخ بیانی بسیار متفاوتی از یک توده کروی در کشت مشاهده شود امری نادر نیست (۹۳، ۹۵). بنابراین عرضه CSCs در محیط کشت می‌تواند نیم‌رخ بیانی ژن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. هم‌چنین بقای علامت بیان ژنی ویژه CSCs، محدود به چند پاساژ است. باوجود همه این کاستی‌ها، کشت CSCs می‌تواند در پیش‌گویی بیماران به ترکیب متفاوت داروها مناسب باشد. برای نمونه متوقف کننده مسیر Notch بر روی تومور مغزی نخاعی مورد آزمایش قرار گرفته و موجب شده است که اثر بخشی آن به صورت *in vivo* نیز تایید شود (۶۴). این رویکرد می‌تواند برای غربالگری داروهای موثر بر CSCs مورد استفاده قرار گیرد.

جمع بندی

با توجه به چالش‌های موجود در تعریف مناسب و قابل قبول برای الگو و دیدگاه به وجود آمدن و گسترش سرطان، مشکلاتی عمده‌ای را در ارتباط با مطالعه و درمان سرطان‌ها به وجود آورده است. بنابراین در مرحله اول یک تعریف جامع و مناسب در این زمینه ضروری است. در راستای این مهم، نظریه CSC

REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA: a cancer journal for clinicians 2013;63:11-30.
2. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature 2013;501:328-37.
3. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. Br J Cancer 2013;108:479-85.
4. Maitland ML, Vasisht K, Ratain MJ. TPMT, UGT1A1 and DPYD: genotyping to ensure safer cancer therapy? Trends Pharmacol Sci 2006;27:432-37.
5. Noori-Dalooi MR, ed. Medical molecular genetics in the third millennium. Tehran: Samer Publishing; 2012.
6. Noori-Dalooi MR, ed. Emery's elements of medical genetics. Tehran: Jame-e-Negar and Salemi Publishing; 2013. [In Persian]
7. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. Nat Biotechnol 2009;27:44-46.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.
9. Goldie JH. Drug resistance in cancer: a perspective. Cancer Metastasis Rev 2001;20:63-68.
10. Lehembre F, Regenass U. Metastatic disease: a drug discovery perspective. Semin Cancer Biol 2012;22:261-71.
11. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. J Clin Oncol 2008;26:2131-38.
12. Prestegarden L, Svendsen A, Wang J, Sleire L, Skafnesmo KO, Bjerkvig R, et al. Glioma cell populations grouped by different cell type markers drive brain tumor growth. Cancer Res 2010;70:4274-79.
13. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nature Rev Cancer 2005;5:275-84.
14. Kuhn TS. Historical structure of scientific discovery. Science 1962;136:760-64.
15. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3:730-37.
16. Li M. New treatment strategies targeting cancer stem cells. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 2014;36:546-50. [In Chinese]

17. Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 2008;268:1-9.
18. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827-33.
19. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005;65:6207-19.
20. Broadley KW, Hunn MK, Farrand KJ, Price KM, Grasso C, Miller RJ, et al. Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme. *Stem Cells* 2011;29:452-61.
21. Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3629-37.
22. Desrivieres S, Kunz C, Barash I, Vafaizadeh V, Borghouts C, Groner B. The biological functions of the versatile transcription factors STAT3 and STAT5 and new strategies for their targeted inhibition. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2006;11:75-87.
23. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS One* 2008;3:e2428.
24. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007;131:1109-23.
25. Crea F, Mathews LA, Farrar WL, Hurt EM. Targeting prostate cancer stem cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:1105-13.
26. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:732-40.
27. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 2004;6:R605-15.
28. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003;3:756-67.
29. Bolos V, Blanco M, Medina V, Aparicio G, Diaz-Prado S, Grande E. Notch signalling in cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 2009;11:11-19.
30. McKenzie G, Ward G, Stallwood Y, Briend E, Papadia S, Lennard A, et al. Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3-kinase-dependent signals. *BMC Cell Biol* 2006;7:10.
31. Meng RD, Shelton CC, Li YM, Qin LX, Notterman D, Paty PB, et al. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res* 2009;69:573-82.
32. Giovannini C, Gramantieri L, Chieco P, Minguzzi M, Lago F, Pianetti S, et al. Selective ablation of Notch3 in HCC enhances doxorubicin's death promoting effect by a p53 dependent mechanism. *J Hepatol* 2009;50:969-79.
33. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* 2008;18:523-27.
34. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
35. Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, Jablons DM. Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 2003;22:7218-21.
36. Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 2002;21:878-89.
37. Ohigashi T, Mizuno R, Nakashima J, Marumo K, Murai M. Inhibition of Wnt signaling downregulates Akt activity and induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells. *Prostate* 2005;62:61-68.
38. Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Develop Cell* 2008;15:801-12.
39. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulates self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006;66:6063-71.
40. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* 2009;1:338-51.

41. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human gliomacrowth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007;17:165-72.
42. Ehtesham M, Sarangi A, Valadez JG, Chanthaphaychith S, Becher MW, Abel TW, et al. Ligand-dependent activation of the hedgehog pathway in glioma progenitor cells. *Oncogene* 2007;26:5752-61.
43. Santini R, Vinci MC, Pandolfi S, Penachioni JY, Montagnani V, Olivito B, et al. Hedgehog-GLI signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem cells* 2012;30:1808-18.
44. Alajez NM, Shi W, Hui AB, Yue S, Ng R, Lo KW, et al. Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy. *Cell Death Differ* 2009;16:1469-79.
45. Crea F, DuhagonSerrat MA, Hurt EM, Thomas SB, Danesi R, Farrar WL. BMI1 silencing enhances docetaxel activity and impairs antioxidant response in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011;128:1946-54.
46. Kennedy JA, Barabe F, Poepl AG, Wang JC, Dick JE. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". *Science* 2007;318:1722.
47. Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 2008;68:5706-15.
48. Artells R, Moreno I, Diaz T, Martinez F, Gel B, Navarro A, et al. Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2010;46:642-49.
49. Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL, Signore M, Lombardi D, Todaro M, et al. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008;14:8205-12.
50. Okayama H, Kumamoto K, Saitou K, Hayase S, Kofunato Y, Sato Y, et al. CD44v6, MMP-7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer. *Oncol Rep* 2009;22:745-55.
51. Celebiler Cavusoglu A, Kilic Y, Saydam S, Canda T, Baskan Z, Sevinc AI, et al. Predicting invasive phenotype with CDH1, CDH13, CD44, and TIMP3 gene expression in primary breast cancer. *Cancer Sci* 2009;100:2341-45.
52. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* 2008; 44: 946-53.
53. Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, et al. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2010;23:450-57.
54. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008;26:3015-24.
55. Vrzalikova K, Skarda J, Ehrmann J, Murray PG, Fridman E, Kopolovic J, et al. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein expression in NSCLC patients: a tissue microarray study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:1037-42.
56. Vormittag L, Thurnher D, Geleff S, Pammer J, Heiduschka G, Brunner M, et al. Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;73:913-18.
57. Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009;22:709-17.
58. Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, Brachwitz K, Wai DH, Dirksen U, et al. Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer* 2008;44:699-709.
59. Yoshikawa R, Nakano Y, Tao L, Koishi K, Matsumoto T, Sasako M, et al. Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. *Br J Cancer* 2008;98:1670-74.
60. Salnikov AV, Gladkikh J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 2010;126:950-58.
61. Sarvi S, Mackinnon AC, Avlonitis N, Bradley M, Rintoul RC, Rassl DM, et al. CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist. *Cancer Res* 2014;74:1554-65.
62. Liu YP, Yang CJ, Huang MS, Yeh CT, Wu AT, Lee YC, et al. Cisplatin selects for multidrug-resistant CD133+ cells in lung adenocarcinoma by activating Notch signaling. *Cancer Res* 2013;73:406-16.

63. Danesi R, de Braud F, Fogli S, de Pas TM, Di Paolo A, Curigliano G, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Rev* 2003;55:57-103.
64. Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, et al. NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 2010;28:5-16.
65. Lee SM, Moon J, Redman BG, Chidiac T, Flaherty LE, Zha Y, et al. Phase 2 study of RO4929097, a gamma-secretase inhibitor, in metastatic melanoma: SWOG 0933. *Cancer* 2015; 121: 432-40.
66. De Jesus-Acosta A, Laheru D, Maitra A, Arcaroli J, Rudek M, Dasari A, et al. A phase II study of the gamma secretase inhibitor RO4929097 in patients with previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 2014;32:739-45.
67. Palomero T, Ferrando A. Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:S205-10.
68. Westhoff B, Colaluca IN, D'Ario G, Donzelli M, Tosoni D, Volorio S, et al. Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:22293-98.
69. Park JT, Li M, Nakayama K, Mao TL, Davidson B, Zhang Z, et al. Notch3 gene amplification in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006;66:6312-18.
70. Lee SH, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of NOTCH1, 2, 3 and 4 genes in common solid cancers and acute leukemias. *APMIS* 2007;115:1357-63.
71. Fu YP, Edvardsen H, Kaushiva A, Arhancet JP, Howe TM, Kohaar I, et al. NOTCH2 in breast cancer: association of SNP rs11249433 with gene expression in ER-positive breast tumors without TP53 mutations. *Mol Cancer* 2010;9:113.
72. Villaronga MA, Lavery DN, Bevan CL, Llanos S, Belandia B. HEY1 Leu94Met gene polymorphism dramatically modifies its biological functions. *Oncogene* 2010;29:411-20.
73. Hart LS, El-Deiry WS. Invincible, but not invisible: imaging approaches toward in vivo detection of cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008;26:2901-10.
74. Heyn C, Ronald JA, Ramadan SS, Snir JA, Barry AM, MacKenzie LT, et al. In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn Reson Med* 2006;56:1001-10.
75. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 2008;123:1991-2006.
76. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer* 2006;12:5615-21.
77. Theodoropoulos PA, Polioudaki H, Agelaki S, Kallergi G, Saridaki Z, Mavroudis D, et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett* 2010;288:99-106.
78. Lang JE, Hall CS, Singh B, Lucci A. Significance of micrometastasis in bone marrow and blood of operable breast cancer patients: research tool or clinical application? *Expert Rev Anticancer Ther* 2007;7:1463-72.
79. Slade MJ, Coombes RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:30-41.
80. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
81. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.
82. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24 (-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 2008;98:756-65.
83. Noori-Dalooi MR, Maheronnaghsh R, Sayyah MK. Molecular genetics and gene therapy in esophageal cancer: a review article. *Tehran University Medical Journal* 2011;69:331-43. [In Persian]
84. Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:887-99.
85. Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2003;103:642-46.

86. Noori-Dalooi MR, Tabarestani S. Molecular genetics, diagnosis and treatment of breast cancer: review article. *J Sabzevar Univ Med Sci* 2010;17:74-87. [In Persian]
87. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007;117:3988-4002.
88. Galvani E, Toffalorio F, Peters GJ, De Pas T, Giovannetti E. Pharmacogenetics of non-small cell lung cancer (NSCLC): time to "work it out"? *Curr Pharm Des* 2014;20:3863-74.
89. Funel N, Giovannetti E, Del Chiaro M, Mey V, Pollina LE, Nannizzi S, et al. Laser microdissection and primary cell cultures improve pharmacogenetic analysis in pancreatic adenocarcinoma. *Lab Invest* 2008;88:773-84.
90. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Khsai O, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood* 2009;114:4099-107.
91. Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR, Chiapero-Stanke L, et al. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R52.
92. Huang X, Ketova T, Litingtung Y, Chiang C. Isolation, enrichment, and maintenance of medulloblastoma stem cells. *J Vis Exp* 2010;(43).
93. Duhagon MA, Hurt EM, Sotelo-Silveira JR, Zhang X, Farrar WL. Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres. *BMC Genomics* 2010;11:324.
94. Garraway IP, Sun W, Tran CP, Perner S, Zhang B, Goldstein AS, et al. Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. *Prostate* 2010;70:491-501.
95. Dubrovska A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C, et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:268-73.