

چالش‌های مدل‌سازی سرطان سینه با گیرنده‌ی مثبت -هورمون در موش‌ها

تومورهای گیرنده‌ی مثبت استروژن (ER+)، ۷۰ الی ۸۰ درصد از کل موارد سرطان سینه (BC) را تشکیل می‌دهد و توسط وابستگی به استروژن برای رشدشان مشخص می‌شوند. درمان‌های اندوکراینی با استفاده از آنتاگونیست‌های گیرنده استروژن یا مهارکننده‌های آروماتاز یک مولفه کلیدی استاندارد مراقبت برای این تومورها را نشان می‌دهد. عود مجدد یا مقاومت ایجاد شده در برابر قطع استروژن، نشان‌دهنده‌ی یک مشکل بالینی مهم است که بقای بیمار را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این، با وجود پیامدهای مطلوب اولیه، سالها یا حتی دهه‌ها پس از بهبود ظاهری، بخشی از بیماران ER+ BC عود مجدد بیماری را به طور موضعی یا در نقاط دور (نقاط دیگر) نشان می‌دهند. مدل‌های داخل بدن موجود زنده (In vivo) که بدقت بیماری در انسان را شبیه‌سازی می‌کنند به طور ضرور (فوری) برای مطالعه بیولوژی این تومورها، بررسی مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز مقاومت اندوکراینی و شناسایی بیماران در معرض خطر عود موردنیاز است. با وجود شباهت‌ها در تنظیم کلی هورومونی رشد غده پستانی بین موش‌ها و انسان‌ها، اکثر بدخیمی‌های (کارسینوماهای) پستانی که در مدل‌های موشی مهندسی‌شده‌ی ژنتیکی (GEMMs) رخ می‌دهد، ER منفی هستند و اکثر مدل‌های Xenograft مبتنی بر اندک رده‌های سلولی سرطانی ER+ می‌باشند. ما به تازگی نشان دادیم که ریزمحیط^۲ برای سلول‌های سرطانی ER+ بسیار حیاتی بوده و در این مقاله مروری، پتانسیل مدل Xenograft درون مجرای (درون داکتال)^۳ برای تحقیقات بنیادی و پیش‌بالینی بحث می‌شود.

مقدمه

سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان غیر پوستی تشخیص داده شده در زنان است و همچنان علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. سرطان سینه (BC) یک بیماری هتروژن^۴ است که شامل زیرتایپ‌های مختلفی با ویژگی‌های بالینی و هسیتوپاتولوژیکی مجزا می‌باشد. تومورها به طور سنتی همانطور که توسط ایمنوهیستوشیمی (IHC) و یا در هیبریدیزاسیون درجا^۴ (ISH) ارزیابی می‌شود بر اساس حضور یا عدم حضور گیرنده استروژن (ER)، گیرنده‌ی پروژسترون (PR) و گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی-۲ (HER2) طبقه‌بندی می‌شوند. تومورهای فاقد بیان هر ۳ گیرنده، منفی سه‌گانه نامیده می‌شوند (TN).

^۱ پیوند از حیوان به بیمار

^۲ microenvironment

^۳ intraductal

^۴ in situ hybridization

تومورهای گیرنده‌ی مثبت هورمون (ER+), ۷۰ الی ۸۰ درصد از کل موارد سرطان سینه (BC) تهاجمی را تشکیل می‌دهد و واحد زیادی با ۲ زیرتایپ مولکولی لومینال همپوشانی دارد. تومورهای A و B لومینال توسط الگوهای (امضاهای) تکثیر سلولی متمایز می‌شوند که در ایمنوهایستوشیمیایی از طریق شاخص بالاتر Ki67 (با کات‌آف حدود ۲۰ درصد) در سرطان سینه B لومینال انعکاس می‌یابد. بیشتر سرطان‌های سینه ER+ از نوع خاصی (NST) نیستند، متداولترین زیرتایپ ویژه هسیتولوژی، کارسینومای لوبولار تهاجمی (ILC) است که ۱۰ الی ۱۵ درصد از موارد سرطان سینه را تشکیل می‌دهد.

شیوع و پیامد زیرتایپ‌های مختلف از نظر سن، نژاد و وضعیت یائسگی متفاوت می‌باشد و مشخصه‌های بالینی و مولکولی اجازه ارزیابی پیش‌آگهی و تخصیص مناسب‌ترین درمان برای بیماران به صورت فردی را می‌دهد. بیان ER حداقل در ابتدا با پیش‌آگهی مطلوب‌تر همراه است و برای پاسخگویی به درمان‌های اندوکراینی پیش‌بینی‌کننده است. تومورهای ER+ برای رشد وابسته به استروژن است و توسعه درمان‌های اندوکراینی که پیام‌رسانی ER را مورد هدف قرار می‌دهد، یکی از بزرگترین پیشرفت‌های بالینی از ۵۰ سال گذشته بوده است. در واقع، به عنوان یک الگوی برای درمان‌های هدفمند در خون‌شناسی (انکولوژی) بکار برده می‌شود. با این حال، حدود ۲۰ درصد از بیماران به درمان‌های خط اولیه اندوکراینی پاسخ نمی‌دهند و تا ۵۰ درصد، تحت درمان از طریق مکانیسم‌های مختلف، مقاوم می‌شوند. بعلاوه، سالها یا حتی دهه‌ها پس از بهبودی ظاهری، سرطان‌های ER+ مستعد عود در نقاط دیگر (دوردست)، عمدتاً در استخوان هستند. این پدیده به حضور سلول‌های توموری ER+ نسب داده شده است که احتمالاً در نتیجه تغییرات در سیگنال‌های ریزمحیطی و مراقبت ایمنی‌ممکن است در اندام‌های مختلف در حال کمون باقی مانده و مجدداً فعال شوند. بنابراین، با وجود بهبود قابل توجه نرخ بقای ۵ ساله آنها، به دلیل عود دیررس، برآیند بلندمدت بیماران مبتلا به BC ER+ بهتر نیست. از آنجا که این تومورها بیش از ۷۰ درصد از کل سرطان‌های سینه را دربرمی‌گیرند، بیشتر مرگ و میرهای ناشی از سرطان سینه قابل نسبت به بیماری ER+ می‌باشند. بنابراین، به منظور توضیح مکانیسم‌های مسبب مقاومت اندوکراینی و شناسایی بیماران در معرض خطر عود، مدل‌های داخل بدن موجود زنده (in vivo) به منظور مطالعه بیولوژی BC ER+ به‌طور فوری موردنیاز می‌باشند. متأسفانه، به دلیل عدم کافی بودن مدل‌های in vivo، پیشرفت مختل شده است. با وجود شباهت‌ها در تنظیم کلی هورمونی رشد غده پستانی بین موش‌ها و انسان‌ها، اکثر کارسینوماهای (بدخیمی‌های) پستانی در مدل‌های موشی مهندسی‌شده ژنتیکی، ER منفی (ER-) هستند و دلایل آن مبهم باقی مانده است. در این مقاله مروری، ما در مورد چالش‌ها در تولید مدل‌های موشی BC ER+

آموخته‌های کسب شده از تلاش‌های قبلی و نوید و چالش‌های استفاده از کاشت داخل مجرای سلول‌های ER+ به مدل بیماری بحث می‌کنیم.

مدل‌های جوندگان با استفاده از موادشیمیایی و مدل‌های موشی مهندسی‌شده ژنتیکی (GEMMs)

مدل‌های کارسینومای پستانی جوندگان با استفاده از مواد شیمیایی که در دهه ۱۹۸۰ توسعه یافته به طور گسترده برای بررسی سرطان سینه وابسته به هورمون مورد استفاده قرار گرفته است. تومورها در رت‌ها با یک دوز واحد خوراکی ۱۲،۷ دی متیل بنز(آ) آنتراسن^۱ (DMBA) یا تزریق داخل وریدی یا زیرجلدی آن-متیل نیتروسورا (NMU) القا می‌شود؛ و با یک تاخیر(نهفتگی) بین ۸ و ۱۲ هفته‌ای و بروز تقریباً ۱۰۰ درصدی شکل می‌گیرند. هر دو تومور ایجاد شده با NMU و DMBA موجب بیان ER و PR می‌شوند. تجویز مدروکسی پروژسترون استات (MPA)، دوره نهفتگی را کاهش داده و بروز تومورهای ناشی از DMBA را افزایش می‌دهد. به طور مهم، این تومورها به طور اعتقادی موجب باززایش ابعاد مختلف بیماری در انسان می‌شود. رشد آنها در صورت وابستگی به هورمون و بارداری قبل از قرارگرفتن در معرض کارسینوژن، بروز تومور را کاهش می‌دهد. با این حال، این مدل‌ها به آسانی تابع مطالعات مکانیکی نبوده زیرا مهندسی ژنتیک مدل‌های موشی (رت) مدت زمان طولانی چالش برانگیزی آنها را اثبات کرده است. تنها اخیراً با ظهور TALEN (نوکلئاز افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی)^۲ و کریسپر (CRISPR)، گام تکنولوژی برداشته شده است. تا به امروز، در عوض بیشتر تلاش تحقیقات بر روی مدل‌های موش متمرکز شده است که می‌تواند به آسانی از لحاظ ژنتیکی دستکاری شود. GEMMs یک ابزار دقیق و ظریف برای باززایش کارسینوژن (سرطان‌زایی) در محیط *in vivo* هستند. آنها این مزیت را دارند که در حضور یک سیستم ایمنی دست نخورده^۴ و ریزمحیط اندام با بازآرایی استرومال^۵، التهاب و آنژیوژن، موجب توسعه تومور در بافت مبدا می‌شوند.

GEMMs بسیاری متنوعی گزارش شده است. بیشتر کارسینوماهای پستانی که آنها توسعه می‌دهند، ER منفی می‌باشند. هستیوپاتولوژی‌ها تلاشها و تصویر متنوعی را برای مقایسه آنها با هم‌تایان انسانی، به طور کلی، با مشخصه‌های سنگفرشی و مزانشیمی بیشتر در مدل‌های جوندگان ایجاد کرده است. به طور مشابه، مقایسه با پروفایلینگ جهانی بیان ژن منجر به خوشه‌های متمایز از زیرگروه‌های انسان می‌شود. در مجموع این سوال ایجاد می‌شود که چرا تومورزایی بین گونه‌ها بسیار مختلف است. این امر ممکن است به دلیل تفاوت‌های ذاتی در ترکیب غده پستانی بین موش‌ها و انسان‌ها و یا تفاوتها در محل اندوکراین یا مربوط به

¹ 7,12-dimethylbenz(a) anthracene

² transcription activator-like effector nuclease

³ clustered regularly interspersed short palindromic repeats

⁴ intact immune system

⁵ organ microenvironment with stromal remodeling

تولید مثل و یا زمینه‌های ژنتیکی مختلف باشد. چالش دیگر برای توسعه ER⁺GEMMs، فقدان جهش‌های ژنی محرک است که با اکثر تومورهای ER⁺ مشترک باشد. نشان داده شده است که سرطان سینه ER⁺ و ER⁻ پروفایل‌های جهش سوماتیک مجزایی را به نمایش می‌گذارد. در تومورهای ER⁺، جهش‌ها و تغییرات تعداد کپی از چندین ژن از جمله *Pik3ca*، *PTEN*، *AKT1*، *CDH1* و *TP53* در فرکانس‌های مختلف یافت می‌شود که ناهمگونی بین توموری تومورهای سرطان سینه و ER⁺ را بویژه برجسته می‌سازد. بهره‌برداری از این ژنهای محرک برای تولید موش‌های ترانسژنیک ویژه‌ی اپی‌تلای پستان آسان نیست. همانطور که در مدل‌های موشی بیان جهش *Pik3ca* در انواع مختلف سلول اپی‌تلای پستانی نشان داده شده است، همان جهش می‌تواند موجب القای پلاستیسیته (تمایزپذیری) دیده نشده در سلول‌های نرمال شده و منجر به فتوتیپ‌های مختلف تومور بسته به سلول مبدا (منشاء) شود. همچنین، مراحل رشدی خاص که در آن تغییرات ژنتیکی القاء می‌شوند ممکن است بر اینکه آیا تومورها پستانی ER مثبت باشند، تاثیر بگذارد. برای مثال، لین و همکاران گزارش کردند که حذف *P53* در موش‌ها، پیش از بلوغ و بلوغ، و نه در موش‌های بالغ، منجر به رشد (توسعه) تومورهای ER⁺ می‌شود. با این حال، لازم به ذکر است که در این مطالعه، از ۲ پروموتور مختلف برای تحریک حذف *P53* به واسطه Cre نو ترکیب^۱ استفاده شد که می‌توانست همچنین فنوتیپ تومورهای ایجاد شده را تحت تاثیر قرار دهد. در نهایت، ناتوانی در بازتولید توالی درست وقایع ژنتیکی ممکن است در این امر نقشی داشته باشد. GEMMs مختلف، بیان برخی از ER را نشان می‌دهد اما معمولاً آن را در نتیجه پیشرفت تومور از دست می‌دهند. علاوه بر این، به منظور تعیین اینکه آیا این تومورها مانند بیماری در انسان به راستی وابسته به استروژن هستند، اواریکنومی یا مهار پیام‌رسانی ER با کاربرد بالینی تاموکسیفن تنظیم‌کننده انتخابی ER یا فولوستران کاهش‌دهنده انتخابی ER^۲ نیاز به تبدیل شدن به یک استاندارد برای برقراری GEMM‌های سرطان سینه ER⁺ دارد. تنها چند گروه اواریکنومی یا درمان با تاموکسیفن را انجام داده‌اند و حتی تعداد کمتری کاهش رشد تومور را به مجرد قطع استروژن مشاهده کردند.

استراتژی‌های ویژه‌ای برای تولید تومورهای ER⁺ ابداع شده است که از بیان بیش از حد و مستقیم ER α در سلول‌های اپی‌تلای پستانی تا تغییرات ژنتیکی مولکول‌های اثرگذار بر پیام‌رسانی استروژن، عوامل فارماکولوژیکی همراه با تغییرات ژنتیکی موثر بر پیام‌رسانی استروژن، قرارگیری در معرض ماده سرطان‌زای شیمیایی DMBA در ترکیب با تغییرات ژنتیکی و جفت‌گیری‌های هم‌ژاد موش‌های ترانس‌ژنیک^۳ متغیر است. به طور جالب توجه، نتایج ترغیب‌کننده‌ای از یک مدل غیرمنتظره حاصل شد. در موش‌های *Stat1*^{-/-} تومورهای پستانی توسعه یافت که به طور اعتقادی سرطان را در انسان از طریق پیشرفت آن از نئوپلازی

¹ Cre recombinase-mediated deletion of P53

² selective ER degrader fulvestrant

³ sibling matings of nude mic

سلول‌های پیش‌ساز درون اپی‌تلیالی پستان تا سرطان تهاجمی ER⁺ شبیه‌سازی می‌کند، که مثبت‌بودن قوی ER را نشان داده و به اواریکتومی حساس هستند. با این حال، به دلیل اثرات شدید همزمان بر سیستم ایمنی و دوره کمون ۶ ماهه تومور پستانی، استفاده از آن آسان نیست. مشکلات سیستمی می‌تواند با پیوند اپی‌تلیوم پستانی یا تومورهای پستانی به گیرندگان پیوند سینژنیک کنترل شود. به تازگی، نشان داده شده است که بیان شرطی KRASG12V در اپی‌تلیوم پستانی منجر به تومورهای شبه A لومینال می‌شود که به درمان انتی‌استروژنی پاسخ می‌دهند. Cre از پروموتور بتا لاکتوگلوبین گوسفندی (BLG-Cre) مشتق شده و جهش آنکوژنیک در RSA ترنسژن مشتق از MMTV با بارداری القاء می‌شود؛ در نتیجه، تومورهای موجود در طی ۳-۹ ماه پس از شیردهی (ترشح شیر)، موجب القای این فرض می‌شود که حاملگی و شیردهی ممکن است با القای یک فنوتیپ سلولی متمایز خاص برای تولید تومورهای ER⁺ حیاتی باشد و این رویکرد ممکن است به طور موفقیت‌آمیزی با سایر آنکوژنها مورد بهره‌برداری قرار بگیرد.

مدل‌های xenograft رده سلولی

Xenograft‌های رده‌های سلولی سرطان سینه انسانی به صورت زیرجلدی یا به چربی پستانی موش‌های دچار ضعف ایمنی^۱ اغلب در تست پیش‌بالینی دارو استفاده می‌شوند. یک مجموعه از ۹۰ رده سلولی سرطان سینه انسانی، مشتق از برخی نمونه‌های بدست آمده از تومورهای اولیه، عمدتاً از ریزش مایع به درون فضای جنبی^۲، یعنی بیماری متاستاز ثانویه، عمدتاً از زنان قفقازی در حال حاضر در دسترس می‌باشد. اگرچه ۷۰ درصد از سرطان‌های سینه RE⁺ هستند تنها حدود ۳۰ درصد از رده‌های سلولی از جمله MCF-7، T-47D، BT-474، BT-474، BT-483 و MDA-MB-361، موجب بیان ER می‌شوند. به طور کلی، به نظر می‌رسد ایجاد رده‌های سلولی سرطان ER⁻ در مقایسه با نوع ER⁺ در محیط آزمایشگاهی آسانتر باشد. پیشنهاد شده است که ترشح ماتریکس پروتئین‌های خارج سلولی و همچنین فاکتورهای رشد از جمله EGF و TGF α و گیرنده‌های آنها می‌تواند چسبندگی سلول‌های ER⁻ را به چسبندگی پلاستیک تسهیل کرده و یک حلقه (لوپ) اتوکرینی را برای حفظ رشدشان مستقل از تامین فاکتور رشد اگزوژن فراهم می‌کند.

تنها تعداد کمی از رده‌های سلولی ER⁺ همچون MCF-7، T-47D و ZR-75-1 می‌توانند در محیط بدن موجود زنده ایجاد بشود. موش‌های گیرنده، برای رشد موفقیت‌آمیز این xenografts نیاز به مکمل‌یاری با استروژن اگزوژن (E2) از طریق تزریق روزانه، کاشت pellet‌های زیرجلدی یا مکمل‌باری نوشیدن آب دارند. در نتیجه سطوح استرادیول در موش‌ها با مقادیر یافت شده در زنان قبل از یائسگی مطابقت دارد. این امر با بیماری در انسان در تضاد است که عمدتاً در زنان پس از یائسگی رخ می‌دهد. لازم به ذکر است که زنان پس

¹ immunocompromised

² pleural effusions

از یائسگی تا چهار برابر سطوح استرادیول پایین‌تری نسبت به مردان بالغ دارند. نزدیک شدن به سطوح استروژن فیزیولوژیکی تا حد ممکن مهم است زیرا پیام‌رسانی ER بسیار وابسته به دوز بوده و غلظت بالای استروژن می‌تواند سبب ایجاد اختلافات در رفتار سلول سرطانی شود. علاوه بر مکانیسم عمل کلاسیک شامل اتصال استروژن به گیرنده‌های درون سلولی که منجر به دایمریزاسیون می‌شود و اتصال به عناصر پاسخ استروژن (ERs) در ناحیه پروموتور ژن‌های هدف، استروژن همچنین اعمال سریع، غیرژنومی، میانجی‌شده از طریق گیرنده‌های جفت شده با G-پروتئین مرتبط با غشا که منجر به تولید کلسیم و نیتریک اکسید و فعال شدن مسیرهای مختلف گیرنده تیروزین کیناز می‌شود را نمایش می‌گذارد. پاسخهای سلولی مختلف تحت استروژنهای با دوز بالا یا پایین همراه با دوز پایین ۱۷-استرادیول مشاهده شد که پیام‌رسانی غیرکلاسیک مرتبط با غشا را فعال می‌کند. اثرات سودمند ۱۷-استرادیول بر روی پیوند تومور می‌تواند همچنین به اعمال آنها بر روی سلول‌های استرومال ER+ نسبت داده شود که منجر به بهبود عروق‌زایی تومورها می‌شود.

سطوح E2 (استروژن اگزوژن) فوق فیزیولوژیکی^۱ با اثرات نامطلوب جدیدی مانند هایپرپلازی رحمی و تورم مسیر پایین تولید مثل همراه است که منجر به احتباس ادرای، هیدرونفروزیس و نارسایی کلیه می‌شود. این فاکتورها تفسیر آزمایشات را دچار اختلال کرده و ارتباط بالینی آنها را کاهش می‌دهد. تلاشهایی برای مدل‌سازی پیشرفت تومور که از سلول‌های نرمال اپی‌تلیالی سینه در انسان شروع شده، صورت گرفته است که با بطور خودبخود جاودانه شدند، از لحاظ شیمیایی یا با انتقال لنتی‌ویروسی^۲ با ER و آنکوژنهای مختلف تغییر شکل یافتند. یک مشکل شایع این است که سلول‌های مشتق از اپی‌تلیوم نرمال سینه، بیان گیرنده هورمون را در محیط آزمایشگاهی از دست داده و یک فنوتیپ پایه را توسعه می‌دهد. به طور همزمان، هنگام پیوند xenograft، آنها تمایزپذیری و کراتینیزه شدن سنگفرشی را نشان دادند. همان گروه متعاقباً نشان دادند که تزریق‌های preneoplastic سلول‌های اپی‌تلیال سینه انسان به درون مجاری شیر موش‌های با نقص ایمنی، مدل‌های ER+ را ایجاد می‌کنند که به آدنوکارسینوماهای B لومینال مقاوم به فولوسترانت شباهت دارد. به طور جالب توجه، xenograft‌های رده سلولی AA3184، سلول‌های پستانی مشتق از ریداکشن ماموپلاستی^۳ که به طور شیمیایی تغییر شکل یافته‌ی، زمانی که توام با پرتودرمانی فیبروبلاست‌ها تزریق شدند، سرطان‌های ER+ را بیش از دوره یک ساله شکل داده و مشخصه‌های هیستولوژیکی و مولکولی سازگار با زیر تایپ B لومینال را به نمایش می‌گذارند. آنها به مکمل‌یاری E2 نیاز ندارند لیکن کاهش (تخیله) استروژن در محیط آزمایشگاهی یا در محیط بدن موجود زنده رشدشان را مهار نمی‌کند. مشکل در ایجاد

¹ supraphysiological

² lentiviral

³ معمولاً برای کاهش اندازه، تغییر شکل و یا تغییر بافت سینه‌ها انجام می‌شود. این جراحی شامل برداشتن بافت پستان نیز می‌شود

رده‌های سلولی BC ER+ در بدن موجود زنده، یک مانع خاص برای مطالعات ILC می‌باشد. در مقایسه با کارسینومای مجرای (داکتال) ته‌اجمی، که ۸۰ درصد از سرطان‌های سینه را تشکیل می‌دهد، این زیرتایپ خاص در بیشتر موارد در بیماران مسن تشخیص داده می‌شود و شیوع بالاتری از بیماری سمت مقابل، متاستازهای دستگاه گوارش بویژه تخمدان‌ها و حفره صفاقی دارد. تا به امروز، تعداد معدودی از رده‌های سلولی مانند MDA-MB-134VI، SUM-44 و IPH-926 از ILC محرز شده‌اند. در ابتدا گزارش شد، رده سلولی MDAMB-134VI ER+، که دارای حذف ژن CDH1 در مقیاس وسیعی است، مشتق از سرطان سینه داکتال است و توسط *Reis-Filho* و همکاران بر اساس آنالیز بیان ژن به عنوان ICL دوباره طبقه‌بندی شد. سلول‌های SUM-44 ER+ از یک بیمار مبتلا به ILC و دارای جهش CDH1 بدست آمد. رده سلولی ILC IPH-926 مارکرهای سلول اپی‌تالیالی را بیان می‌کند و حامل جهش هموزیگوت CDH1 است. هیچ یک از آنها به عنوان xenograft زیرجلدی قبل تولید مجدد نبوده‌اند.

محدودیت متداول‌تر GEMM‌های سرطان ER+ و همچنین رده‌های سلولی ER+ محرز شده به عنوان xenograft‌ها که به بسیاری از مدل‌های توموری دیگر گسترش می‌یابد، ظرفیت متاسناز محدود آنها است. احتمالاً به دلیل رشد سریع سلول‌های توموری در نقطه اولیه، بیشتر GEMM‌ها و رده سلولی موش‌های xenograft شده قبل از وقوع ضایعات متاستازی نیاز به آسان‌کشی (مرگ بدون درد) دارند.

مدل‌های xenograft مشتق از بیمار (PDX)

تصور می‌شود که PDX‌ها برای باززایش بیولوژی سرطان در انسان نسبت به xenograft‌های رده سلولی با توجه به پاساژ بلندمدت سلول‌های سرطانی انسان در محیط آزمایشگاهی بهتر باشد که احتمالاً فشار انتخاب وارد بر ژن‌آرا ایجاد می‌کند که منجر به رانش (دریفت) ژنتیکی بوجودآورنده لوکون‌های دختری متمایز از تومورهای اصلی می‌شود. مدل‌های PDX عمدتاً بر کاشت قطعات 1mm^3 مشتق از تومورهای بیمار به چربی پستانی یا زیرجلدی موش‌های با ضعف سیستم ایمنی تکیه دارد. تومورهای که توسعه می‌یابند می‌توانند متعاقباً در موش‌ها پاساژ داده شوند و حتی پس از پاساژهای مختلف در محیط بدن موجود زنده، graft‌ها از لحاظ فنوتیپی و ژنتیکی پایدار باقی مانده و مشخص‌های هیستولوژیکی و مولکولی تومورهای اصلی از جمله پتانسیل متاستازی آن حفظ می‌کنند. علاوه بر این، PDX‌ها پاسخ به درمان را نشان می‌دهند که از نظر بالینی با موارد بدست آمده قابل مقایسه هستند. بنابراین، آنها یک ابزار ارزشمند برای مطالعه ناهمگون‌های

¹ contralateral disease

² euthanize

³ selection pressure

توموری، متاستاز و تست پیش‌بالینی دارو از جمله فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی قبل و بعد از وقوع مقاومت دارویی هستند. با این حال، کشف و دستیابی به تغییرات تعداد کپی در طی پاساژ PDX، احتمالاً به دلیل انتخاب کولون‌های کوچک از قبل موجود، که متفاوت از آنهایی است در بیماران در طول سیر تکاملی تومور است ظاهر می‌شود، اخیراً گزارش شده است.

مهمترین چالش در توسعه PDX ها ER+ میزان پیوند پایین‌تر قابل‌توجه در مقایسه با تومورهای TN یا ERE2 است زمانی که به طور زیرجلدی یا به درون لایه چربی پستانی تحت پیوند xenograft قرار گرفت. در یک مطالعه وسیع که تومورهای ER+ ۳۱۴ پیوند شدند، میزان درصد گیرایی ۲/۵ درصد در مقایسه با تقریباً ۲۵ درصد برای تومورهای غیرلومینال بود. به طور ویژه، PDX های بسیار کمی وجود دارند که از کارسینومای لوبولار و تومورهای A لومینال ER+ درجه پایین و ساده درمان^۱ مشتق شده می‌شود. میزان پیوند نمونه‌های تومور با بقای پایین‌تر بیمار و توانایی متاستازی همبسته است. در نتیجه تعداد ER+ PDX در دسترس کوچک است.

Xenograft های درون مجرای (اینتراداکتال)

تومورهای سینه به طور معمول در بافت چربی یا سایر نقاط زیرجلدی با جراحی کاشت می‌شوند. تا حدی به طور گمراه کننده ذکر "کاشت ارتوتوپیک" به درون غده پستانی ممکن است ترجیح داده شود زیرا با درجه بالاتر عروق‌زایی در مقایسه با پیوند به پوست همراه است. در هر دو مورد، ارتیفکته‌ها (مواد مصنوعی) تولید می‌شوند بطوریکه سلول‌های توموری در تعداد زیاد به طور مستقیم در استروما قرار داده می‌شوند و یک زخم ایجاد می‌شود. سلول‌های توموری که از منشاء اپی‌تلیال هستند و در بدن موجود زنده نمو پیدا می‌کنند عمدتاً توسط سلول‌هایی از طبقه‌ی خود احاطه شده‌اند، با همان مولکول‌های چسبان بر روی سطح‌شان، مجبورند با سلول‌های استروما تعامل داشته و به مولکول‌های ECM بچسبند، که در آن، آنها لزوماً گیرنده‌ها را بیان نمی‌کنند. جای تعجب نیست که بیشتر سلول‌ها می‌میرند، با این حال، هنگامی که تومورها شکل می‌گیرند، از جمله تومور ER+ مکمل‌دهی شده با E2 اگزوزن، آنها به سرعت با شاخص Ki67 بالا رشد می‌کنند که یک نمونه بارز برای تومورهای گیرنده مثبت هورمون نیست.

Behbod و همکاران، سلول‌های DCIS انسانی را جای‌گذاری کردند، در میان آنها ضایعات ER+، درون محل دقیق آناتومیکی جایی که آنها بوجود می‌آیند با تزریق چند میکرولیتر سوسپانسیون سلول به داخل مجرای شیر، بیماری درجا را در حضور پلت‌های E2 مورد مطالعه قرار گرفتند. بر خلاف ۱ میلیون سلول

¹ lower-grade and treatment-naïve ER+ luminal A tumors

سرطانی یا بیشتر که به طور معمول برای ایجاد تومور در چربی زیرجلدی تزریق می‌شوند، با استفاده از روش درون مجرای کمتر از ۱۰ درصد تعداد سلول کافی بود. سلول‌ها ابتدا به درون مجرای اصلی شیر رویت شده با جراحی تزریق شدند. کار بعدی نشان داد که سلول‌ها یا نانوذرات‌ها می‌توانند به طور مشابه از طریق نیپل (نوک پستان) برای جلوگیری از اختلال بافت مطرح شوند.

با استفاده از این رویکرد، ما پانلی از رده‌های سلولی بیانگر زیرتایپ‌های مختلف را به طور مستقیم به درون مجرای شیر موش‌های دچار ضعف ایمنی تزریق کردیم و نشان دادیم که تمام آنها بدون مکمل‌یاری E2 رشد کردند. رده‌های سلولی شبه پایه^۱ تومورهای قابل لمسی را در اوایل ۳ هفته پس از تزریق بوجود آوردند و به محض آنالیز ماکروسکوپی و هسیتولوژیکی به عنوان تومورهای عروقی شده و تهاجمی معرفی شدند. BT474 بیان‌کننده بیش از حد HER2، ویژگی‌های نهادهی چربی‌دانه^۲ را نشان داد در حالی که رده‌های سلولی لومینال مرحله طویل شده درجا و تورم مجرای شیر را متحمل شدند اما به سختی اندازه‌ی غده پستانی را تحت‌تاثیر قرار داد. عروق خونی اطراف مجاری شیری متورم پراکنده شد و شاخص Ki67 به شاخص سرطان‌های سینه ER+ انسانی نزدیک شد. مقایسه‌ی سلول‌های MCF-7 قرار گرفته در لایه چربی و به صورت درون مجرای توسط پروفیلینگ جهانی بیان ژن نشان داد که استرومای پستانی موجب القای پیام‌رسانی TGFβ/SLUG می‌شود که منجر به تمایزپذیری بنیادی می‌شود، در حالی که ریزمحیط درون مجرای بیان ER، گیرنده آندروژن (AP) و گیرنده هورمون رشد (GR) و گیرنده مهم دیگر در فیزیولوژی پستانی را افزایش می‌دهد. در مقابل، رده‌های سلولی سرطان سینه شبه بنیادی^۳ هیچ‌گونه تغییر بیان ژن معنی‌داری مربوط به دو نقطه آناتومیک مجزا را نشان ندادند. بنابراین، ریزمحیط درون مجرای یک تعیین‌کننده فنوتیپ سلولی سرطان سینه حساس به هورمون/لومینال است، نه تنها آن سلول‌ها را قادر می‌سازد که خودشان را ایجاد کنند بلکه به آنها اجازه می‌دهد شبیه به محیط محلی خودشان رفتار کنند.

در واقع، تومورهای درون مجرای با توجه به مشخصه‌های هیستولوژیکی، بیان گیرنده هورمون و حتی تشکیل کلسیفه‌شدن‌های ریز^۴ قویا شبیه تومورهای اصلی است، این کلسیفه شدن یک مشخصه بالینی سرطان سینه که وقتی که تومورها در سایر نقاط آناتومیک کاشته می‌شوند، مشاهد نمی‌شوند. به طور مهم، دوره بیماری تاحد زیادی عود (بازایش) می‌کند؛ از لحاظ بالینی میکرومتاستازهای خودبخودی در اندام‌های مرتبط مانند مغز، استخوان‌ها، شش‌ها و کبد دیده می‌شوند. همچنین، MDA-MB-134VI رده سلولی ILC، به طور موفقیت آمیزی هنگام تزریق به صورت درون مجرای رشد می‌کند که فرصت‌های جدیدی را برای مطالعات in vivo این زیرتایپ ویژه فراهم می‌کند. سلول‌های توموری ER+ جداشده از نمونه‌های تازه

¹ Basal-like cell lines

² comedo

³ basal-like BC cell lines

⁴ microcalcifications

جراحی شده به سرعت با روش درون مجرای با نرخ بین ۳۰ و ۱۰۰ درصد پیوند (engrafted) شدند، که تعداد غده‌های پستانی پیوند شده به طور موفقیت آمیزی در هر تومور را نشان می‌دهد. میزان گیرایی، مستقل از گرید تومور و زیرتایپ‌های تومور بود و کارسینومای لوبولار را شامل شد. وقتی که تومورها به‌طور درون مجرای پیوند شدند به طور مشابه، آپوکرین مولکولی، تومورهای سینه AR-مثبت با میزان موفقیت بالایی به طور مشابه رشد کردند.

هر دو رده سلولی و xenograft های مشتق از بیمار به روش پیش‌بینی‌شده به شیمی‌درمانی و درمان‌های اندوکراینی پاسخ دادند. این بدان معنی است که اکنون می‌توان از درمان‌های in vivo برای سرطان سینه ER+ در سطوح هورمونی فیزیولوژیکی پس از یائسگی استفاده کرد و مطالعات را می‌توان برای چندین ماه بدون به خطر افتادن بقای موش‌ها به دلیل اثرات نامطلوب مرتبط با E2، ادامه داد.

چالش‌های باقی‌مانده و چشم‌انداز

محدودیت کلیدی مدل‌های پیوند xenograft درون مجرای، این است که آنها در موش‌های با نقص ایمنی فاقد لنفوسیت‌های T و B و سیستم ایمنی ذاتی کاملاً کاربردی ایجاد می‌شود. اینکه تا چه حد عدم پاسخ سیستم ایمنی نرمال بر کارسینوم‌های سینه ER+ در مراحل مختلف اثرگذار است پوشیده باقی مانده است. معرفی مهارکننده‌های نقاط واریسی ایمنی که CTLA4 یا محور PD1/PD-L1 را هدف قرار می‌دهند، یک تغییردهنده بازی در درمان سرطان‌های متاستازی مختلف بوده است و برای اولین بار پاسخ‌های درمانی پایداری در حدود ۱۵ ال ۲۰ درصد از بیماران را فراهم می‌کند. برای غلبه بر این موانع اساسی در تحقیقات PDX و اجازه به محققان برای ارزیابی تعاملات حیاتی درمانی با سیستم ایمنی، تلاش زیادی برای تولید مدل‌های موشی قابل تعمیم به انسان^۱ برای سرطان شده است که نوید بهبود کارایی مدل‌ها را می‌دهد.

سه استراتژی اصلی برای ایجاد سیستم ایمنی بدن انسان در موش‌های با نقص ایمنی تهی از IL2Rgamma بکار گرفته می‌شود. اولین مدل، موش HU-PBLSCID (لکوسیت‌های خون محیطی انسان - نقص ایمنی ترکیبی شدید)^۲ مبتنی بر تزریق سلول‌های تک هسته‌ای (PBMC) خون محیطی انسان است که منجر به بهبود گرفتن پیوند (engraftment) سلول‌های CD3+ T انسانی پس از یک هفته می‌شود. این روش در ابتدا برای مطالعه‌ی پیوند در مقابل بیماری میزبان (GvHD) مورد استفاده قرار گرفت که ظرف مدت ۱ الی ۲ ماه

¹ humanized mouse models

² SCID

نمایان می‌شود، و تنها یک پنجره آزمایشی (تجربی) کوتاه را ارائه می‌دهد. مدل دوم، موش Hu-SRC¹ تشکیل دوباره جمعیت در انسان با نقص ایمنی ترکیبی شدید²، شامل پیوند سلول‌های بنیادی خونساز³ CD34+ انسانی بدست‌آمده از مغز استخوان یا بسیج‌شده از خون محیطی با استفاده از فاکتور تحریک کننده کلونی گرانولوسیت (G-CSF) است که منجر به engraftment (بهبود گرفتن پیوند) سیستم ایمنی کامل انسان می‌شود. موانع که وجود دارند این است که سلول‌های T انسان در تیموس موش توسعه می‌یابد و بنابراین H2 و نه HLA محدود شده، شناخت سلول‌های سرطانی در انسان را محدود می‌کنند. با این حال، xenograft‌های سرطان سینه در انسان که نفوذ سلول ایمنی را نشان می‌دهد با استفاده از موش‌های HU-SRC-SCID⁴، شرح داده شده است. مدل سوم، مغز استخوان/کبد/تیموس (BLT) موش، که اصلاح مدل HU-SRC است و قوی‌ترین مدل موجود engraftment سیستم ایمنی انسانی را نشان می‌دهد. این مدل از طریق پیوند (فراکاشت) کبد و تیموس جنین انسان در زیر کپسول کلیه ایجاد می‌شود و تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی خونساز کبد جنینی، سبب ایجاد تمام دودمان‌های سلول‌های ایمنی انسانی می‌شود. این روش این مزیت را دارد که سلول‌های T انسانی در تیموس انسان پرورش یافته و بنابراین HLA محدود شده و ایمنی مخاطی عملکردی را توسعه می‌دهد. این مدل دوباره یک سندروم شبه GVHD شدید را ۵-۶ ماه پس از بازسازی³ ایجاد می‌کند که مستعد ابتلا به لنفومای تیموس می‌باشد. تولید ER+ PDX و xenograft در موش‌های قابل تعمیم به انسان⁴ که دارای یک سیستم ایمنی انسانی عملکردی هستند می‌تواند اساساً موجب بهبود درک ما از تداخل بین سیستم ایمنی میزبان و سرطان‌های ER+ شود که به محققان پیش‌بالینی اجازه می‌دهد ایمونوتراپی‌ها را آزمایش کرده و درمان‌های جدیدی را در زمینه پاسخ ایمنی ارزیابی کنند. با این حال، ما باید بخاطر داشته باشیم که موش‌های قابل تعمیم به انسان در حال حاضر به دلیل تفاوت‌ها در فراوانی نسبی انواع سلول‌های ایمنی بازسازی شده (به عنوان مثال، گرانولوسیت‌ها ۶۵-۷۵ درصد از لکوسیت‌ها را در خون انسان تشکیل می‌دهند که این مقدار برای موش‌های قابل تعمیم به انسان ۲-۳ درصد است) و تمایزپذیری و بلوغ ناکافی سلول‌های انسانی به علت حضور سایتوکین‌های موش، به طور کامل قادر به بازتاب پاسخ‌های ایمنی انسانی نیستند. بیان وابسته به پلاسمید یا knockin ژن‌های انسانی کدکننده سایتوکین‌ها، تمایزپذیری و عملکرد سلول‌های ایمنی ذاتی را که از کبد جنین انسان یا سلول‌های بنیادی بالغ به موش‌ها پیوند می‌شود، بهبود می‌بخشد. اگرچه مدل درون مجرای بر ضرورت جایگزینی E2 اگزوزنر برای ایجاد تنظیمات بیشتر ER+ xenografts/PDX سطوح هورمونی اندوژنر موش غلبه دارد، مطالعه رفتار سلول‌های سرطانی تحت غلظت‌های هورمونی فیزیولوژیکی

¹ human-SCID repopulating

² hematopoietic stem cells (HSCs)

³ reconstitution

⁴ Humanized mice

لازم خواهد بود. محیط هورمونی یک موش با چرخه‌های فحلی مکرر^۱ با چرخه در بیمار پس از یائسگی یکسان نیست. علاوه بر این، بخش مهمی از سرطان‌های سینه و پاتوژن آنها در زنان پس از یائسگی رخ می‌دهد، تقلید محیط اندوکرائینی پیش از یائسگی در موش‌ها با تغییرات چرخه‌ای آن هنوز چالش مهم دیگری است که باید بدان پرداخته شود. محدودیت‌های دیگر این مدل به ویژگی‌های گونه‌های موش در مقابل انسان مربوط می‌شود. یکی از مهمترین آنها مربوط به آروماتاز است، آنزیمی که تبدیل آندروژن‌ها به استروژن را کاتالیز می‌کند. در حال حاضر، درمان حداقل برای ۵ سال با مهارکننده‌های آروماتاز، سنگ بنای ER+ BC درمانی را در زنان پس از یائسگی نشان می‌دهد و به طور معنی‌داری خطر عود را کاهش می‌دهد. مدل‌های موشی با بیان بیش از حد آروماتاز تحریک شده با پروموتور MMTV (int-5/aromatase) و xenograftها با استفاده از سلول‌های MFC-7 بیان‌کننده بیش از حد آروماتاز، نقش ضروری استروژن‌هایی که بطور موضعی تولید می‌شوند را در تقویت رشد سرطان‌های پستانی ER+ تایید می‌کند و در وهله اول منجر به توسعه مهارکننده‌های آروماتاز می‌شود. با این حال، ژنهای انسان حداقل ۱۰ اگزون اول ویژه بافت متفاوت دارد که بیان آروماتاز را در بسیاری از اندامهای محیطی تشکیل می‌دهد در حالی که در موش‌ها آروماتاز تنها در غدد جنسی و مغز بیان می‌شود. موش‌های با بیان آروماتاز شبه انسانی بیشتر و وسیع‌تر در بافت‌های مختلف توسعه داده شدند اما پیچیدگی‌های بیان در بافت‌های انسانی بازتولید نشد. از این رو، استفاده از موش‌ها به عنوان یک مدل پیش‌بالینی برای مطالعه مهار آروماتاز تا حدی محدودیت دارد. علی‌رغم این نقاط ضعف، مدل‌های زئوگرفت ER+ BC درون مجرای^۲ فرصت‌های جدیدی را برای مطالعات پیش‌بالینی ارائه می‌دهد. هدف‌گیری مسیرهای پیام‌رسانی دیگر همچون مسیرهای MAPK، EGFR و PI3K که به گریز اندوکرائینی کمک می‌کند در حضور سطوح استروژن باید صورت گیرد، که این امر سطوح دیده شده در بیماران ER+ BC را منعکس می‌سازد. علاوه بر این، همانطور که بوسیله توسعه مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین (CDK) نشان داده شد درک تعامل بین فاکتورهای رشد و پیام‌رسانی استروژن پیامدهای بالینی مهمی دارد. پالپوسیکلیب مهارکننده CDK4/6 در ترکیب با آنتی‌استروژنها به طور معنی‌داری سبب بهبود پیشرفت بدون بقا در زنان مبتلا به سرطان سینه RE+ متاستازیک صرف‌نظر از درجه مقاومت اندوکرائینی و سطوح بیان ER یا PR می‌شود و استاندارد جدید خط اول و دوم درمان را برای این بیماران ارائه می‌دهد. با این حال، مقاومت به پالپوسیکلیب به عنوان پیامد بیان بیش از حد سیکلین E (CCNE1) و از دست رفتن RB1 گزارش شده است و ارزیابی درمان‌های ترکیبی جدید و کشف بیومارکرهای پیش‌بینی‌کننده حساسیت یا مقاومت به مهار CDK4/6 نیاز به مدل‌های داخل بدن موجود زنده دارد که قویا سرطان ER+ انسانی را بازآیش می‌کند. پیشرفت‌ها همچنین می‌تواند

^۱ (مدت زمانی است که در آن پستانداری ماده آماده باروری است و به دنبال شریکی برای زادآوری می‌گردد) recurrent estrous cycles

^۲ 10 different tissue-specific first exons

^۳ Intraductal ER+ BC xenograft models

برای درک ما از عود تاخیری بیماری با متاستاز غالب استخوان مورد انتظار باشد که اکثر مرگ‌های ناشی از سرطان را تشکیل می‌دهد. پیوند MCF-7 به صورت درون مجرای الگوی متاستازی ER+ NST معمولی را بازآیش می‌کند و ممکن است برای مطالعه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی ایجادکننده‌ی نهفتگی (کمون) مفید باشد

سرطان سینه در مردان یک بیماری نادر است که ۱ درصد از کل موارد سرطان سینه را تشکیل می‌دهد. کارسینوما داکتال ER+ زیرتایپ بسیار رایج است (بیشتر از ۹۰ درصد). عوامل خطرزا شامل هایپر استروژنیزیشن^۱ به دلیل سندروم کلاینفلتر^۲، اختلال در عملکرد غده جنسی و چاقی می‌شود، اگرچه بیشتر مردان مبتلا به سرطان سینه هیچ یک از این عوامل خطرزا را نشان نمی‌دهند. به دلیل نادر بودن سرطان سینه در مردان، درک فعلی تا حد زیادی مبتنی تعمیم داده‌ها از بیماران زن مبتلا به سرطان سینه است. با این حال، شواهد جدید، تفاوت‌های جنسی قابل توجهی را در تنظیم مسیرهای اصلی پیام‌رسانی، در عملکردهای بافتی مانند به کارگیری سلول ایمنی، و بازآرایی ماتریکس پروتئین‌های خارج سلولی، و در پاسخ به درمان‌های اندوکراینی پیشنهاد می‌کند. از این رو مدل‌های موشی مبتلا به سرطان سینه مردان برای مطالعه این بیماری ویژه در بافت اصلی آنها و محیط هورمونی مناسب و توسعه درمانهای درخور با در نظر گرفتن تفاوت‌ها به جای شباهت‌ها با سرطان سینه زنان مورد نیاز است. چالش آخر برای مدل‌های xenograft و GEMM‌ها، توسعه بایوبسی‌های مایع و بیومارکرها برای سرطان سینه ER+ می‌باشد. CA 15-3 پرکاربردترین بیومارکر با اهمیت پیش آگهی می‌باشد. در طول سالهای گذشته، بایوبسی‌های مایع با استناد به آنالیز سلول‌های تومورهای گردش خون (CTCs) و DNA توموری گردش خون فاقد سلول (ctDNA) به عنوان مارکرهای جانشین برای آگهی در مورد ناهمگونی توموری، توسعه یافته است که تکامل ژنومی تومور در زمان واقعی (ریل تایم) را به تصویر می‌کشد، مکانیسم‌های در حال توسعه مقاومت را شناسایی می‌کند و بار بیماری را اندازه‌گیری می‌کند. بنابراین، کوچک‌سازی روشهای تشخیصی برای هندل کردن نمونه‌های خونی کوچک بدست آمده از موش‌ها و انجام آرایش‌ها برای ردیابی CTC‌ها و ctDNA در مدل‌های موشی مورد نیاز است. برای افراد علاقه مند به استفاده از روش درون مجرای که یک دوره پیشنهاد می‌شود، اطلاعات می‌تواند از این سایت <https://briskin-lab.epfl.ch/PreclinicalModelCourse> بدست آید

¹ hyperestrogenization

² Klinefelter