



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

**تعيين قيم Smac/DIABLO المصلية لدى مرضى  
سرطان سوريين معالجين**

**Determination of serum  
Smac/DIABLO levels in treated Syrian  
cancer patients**

أطروحة قدمت إلى جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة  
والدمويات والمناعيات

إعداد: رشا عرموطي

إشراف: أ.م.د. جمانة الصالح

(1437هـ / 2016 م)

## List of contents قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العنوان
١٠	الدراسة النظرية
١٢	مقدمة Introduction
١٣	Prostate Cancer الفصل الأول: سرطان البروستاتة
١٤	١-١ الوبائيات Epidemiology
١٤	٢-١ غدة البروستاتة Prostate gland
١٥	٣-١ أعراض سرطان البروستاتة Prostate cancer symptoms
١٥	٤-١ عوامل الخطورة Risk factors
١٥	٥-١ تشخيص سرطان البروستاتة Prostate cancer diagnosis
١٥	١-٥-١ فحص المس الشرجي (DRE (Digital rectal examination
١٦	٢-٥-١ معايرة المستضد النوعي للبروستاتة (PSA (Prostate specific antigene)
١٦	٣-٥-١ الخزعة Biopsy
١٧	١-٣-٥-١ درجات سرطان البروستاتة Prostate Cancer grades
١٧	٢-٣-٥-١ مراحل سرطان البروستاتة Prostate Cancer stages
١٩	٦-١ معالجة سرطان البروستاتة Treatment of prostate cance
١٩	١-٦-١ المعالجة الجراحية واستئصال البروستاتة Prostatectomy
١٩	٢-٦-١ المعالجة الإشعاعية Radiation therapy
١٩	٣-٦-١ المعالجة بالبرودة Cryosurgery
١٩	٤-٦-١ المعالجة الهرمونية Hormone therapy
٢٠	٥-٦-١ المعالجة الكيميائية Chemoherapy
٢١	Bladder Cancer الفصل الثاني: سرطان المثانة
٢٢	١-٢ الوبائيات Epidemiology
٢٢	٢-٢ المثانة Bladder
٢٢	٣-٢ أسباب سرطان المثانة وعوامل الخطورة
٢٣	٤-٢ أعراض سرطان المثانة Bladder cancer symptoms

٢٣	٥-٢ تشخيص سرطان المثانة Bladder cancer diagnosis
٢٤	٦-٢ معالجة سرطان المثانة Bladder cancer treatment
٢٦	الفصل الثالث : الاستماتة Apoptosis
٢٧	١-٣ مقدمة عامة
٢٨	٢-٣ التمييز بين الاستماتة Apoptosis والنخر Necrosis
٢٩	٣-٣ سبل الاستماتة Apoptosis Pathways
٣٠	١-٣-٣ السبيل الخارجي Extrinsic Pathway
٣٢	٢-٣-٣ السبيل الداخلي المتقدي للإستماتة Intrinsic mitochondrial pathway
٣٦	٣-٣-٣ سبيل Perforin/granzyme
٣٧	٤-٣-٣ سبيل التنفيذ Execution pathway
٣٨	٤-٣ الاستماتة والسرطان Apoptosis and cancer
٤٠	١-٤-٣ خلل التوازن بين بروتينات الإستماتة البدئية والبروتينات المضادة للإستماتة
٤١	٢-٤-٣ زيادة التعبير عن مثبطات بروتينات الاستماتة IAPs
٤٢	٣-٤-٣ انخفاض فعالية Caspases
٤٢	٤-٤-٣ عيوب وطفرات في بروتين P53
٤٢	٥-٤-٣ ضعف إشارة مستقبلات الموت
٤٣	٥-٣ تقييم استجابة الورم للمعالجة
٤٣	١-٥-٣ طرق قياس تقييم الاستجابة للمعالجة
٤٥	الفصل الرابع: Smac/DIABLO
٤٦	١-٤ مقدمة
٤٦	٢-٤ جين Smac/DIABLO
٤٧	٣-٤ بنية Smac/DIABLO
٤٩	٤-٤ آلية عمل Smac/DIABLO
٥٢	١-٤-٤ الوسائط المؤثرة في عمل Smac/DIABLO
٥٣	٥-٤ Smac/DIABLO والسرطان

٥٣	١-٥-٤ العلاقة بين التعبير عن Smac/DIABLO وتقدم الورم
٥٤	٢-٥-٤ استخدامات Smac/DIABL العلاجية
٥٥	١-٢-٥-٤ محاكيات Smac/DIABLO mimetics
٥٧	الدراسة العملية
٥٨	١- هدف الدراسة Aim of Study
٥٩	٢- المواد والطرق Materials and methods
٥٩	١-٢-٢ مجموعات الدراسة Study groups
٦٠	٢-٢ الاعتيان Sampling
٦٠	١-٢-٢ مراحل العمل
٦٣	٣-٢ الموافقة المستنيرة
٦٤	٤-٢ الطرق المستخدمة Used methods
٦٤	١-٤-٢ طريقة المقايسة
٦٤	٢-٤-٢ مبدأ المقايسة
٦٥	٥-٢ التحليل الإحصائي Statistical analysis
٦٦	٣- النتائج Results
٦٦	١-٣ نتائج دراسة Smac/DIABLO عند مرضى سرطان المثانة
٦٦	١-١-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي عند مجموعة المرضى وعند المجموعة الشاهدة
٦٧	٢-١-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى المجموعة الشاهدة ومجموعات مرضى سرطان المثانة
٦٩	٣-١-٣ نتائج دراسة علاقة الارتباط بين مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO المصلي والاستجابة السريرية
٧٥	٢-٣ نتائج دراسة Smac/DIABLO عند مرضى سرطان البروستاتة
٧٥	١-٢-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي عند مجموعة المرضى وعند المجموعة الشاهدة
٧٦	٢-٢-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي عند مجموعة المرضى وتركيز PSA

---

٧٧	٣-٢-٣ نتائج دراسة علاقة الارتباط بين مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO المصلي والاستجابة السريرية
٨١	٤- المناقشة Discussion
٨٦	٥- الاستنتاجات Conclusion
٨٧	٦- التوصيات والمقترحات Recommendation and suggestions
٨٨	٧- الملخص باللغتين العربية والانكليزية Summary
٩١	٨- المراجع References

---

## قائمة الجداول List of tables

رقم الصفحة	الجدول
٣١	الجدول (١): بروتينات السبيل الخارجي ووظيفتها
٣٥	الجدول (٢): بروتينات السبيل الداخلي ووظيفتها
٧٠	الجدول (٣): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى مع الاستجابة السريرية لمرضى سرطان المثانة
٧٣	الجدول (٤): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الثالثة مع الاستجابة السريرية لمرضى سرطان المثانة
٧٩	الجدول (٥): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى مع الاستجابة السريرية لمرضى سرطان البروستاتة
٨٠	الجدول (٦): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الثالثة مع الاستجابة السريرية لمرضى سرطان البروستاتة

## قائمة الأشكال List of figures

رقم الصفحة	الشكل
١٤	الشكل (١): نسب انتشار السرطانات في لبنان عام ٢٠١٠
١٤	الشكل (٢): غدة البروستاتة ومناطقها
١٨	الشكل (٣): مراحل سرطان البروستاتة
٣١	الشكل (٤): رسم يمثل السبيل الخارجي لعملية الاستماتة
٣٥	الشكل (٥): رسم يمثل السبيل الداخلي لعملية الاستماتة
٣٨	الشكل (٦): تقديم تمثيلي لأحداث الاستماتة
٣٩	الشكل (٧): مجموعة من الآليات التي تساهم في الهروب من الإستماتة ونشوء السرطان
٤٠	الشكل (٨): تقديم تمثيلي لأفراد عائلة Bcl-2
٤١	الشكل (٩): تقديم تمثيلي لأفراد عائلة IAPs
٤٧	الشكل (١٠): جين Smac/DIABLO وتوضعها على الصبغي 12
٤٨	الشكل (١١): بنية بروتين Smac/DIABLO
٤٩	الشكل (١٢): رسم تمثيلي لبنية Smac/DIABLO
٥١	الشكل (١٣): آلية عمل Smac/DIABLO
٥٢	الشكل (١٤): البروتينات المتدخلة في عمل Smac
٦٠	الشكل (١٥): توزع مجموعات الدراسة
٦٥	الشكل (١٦): منحنى العلاقة بين الكثافة الضوئية المقاسة في الدراسة وتراكيز المحاليل العيارية لـ Smac/DIABLO
٦٧	الشكل (١٧): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان المثانة
٦٨	الشكل (١٨): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعات مرضى سرطان المثانة
٦٩	الشكل (١٩): تراكيز Smac/DIABLO المختلفة عند كل مريض و مريضة خلال مراحل المعالجة ( قبل البدء بالمعالجة الكيميائية، وبعد أسبوع من الجرعة الأولى و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة)

الشكل (٢٠): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة  
الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان البروستاتة

الشكل (٢١): العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO وتركيز PSA  
لدى مجموعة مرضى سرطان البروستاتة

الشكل (٢٢): تراكيز Smac/DIABLO المختلفة عند كل مريض خلال  
مراحل المعالجة ( قبل البدء بالمعالجة الهرمونية، وبعد أسبوع من الجرعة  
الأولى و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة)

## List of abbreviations قائمة الاختصارات

Second mitochondrial-derived activator of caspases – director inhibitor of apoptosis-binding protein with LOw pl	<b>Smac/DIABLO</b>
Tumor necrosis factor $\alpha$	<b>TNF<math>\alpha</math></b>
Fas ligand	<b>Fas L</b>
death-inducing signaling complex	<b>DISC</b>
TNFR1-associated death domain	<b>TRADD</b>
Fas-associated death domain	<b>FADD</b>
nerve growth factor	<b>NGF</b>
FLICE-like inhibitory protien	<b>FLIP</b>
nuclear factor-kB	<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>
TNF-like WEAK inducer of apoptosis	<b>TWEAK</b>
BCL2 interacting protein BIM	<b>Bim</b>
BCL2 interacting killer	<b>Bik</b>
BCL2 antagonist of cell death	<b>Bad</b>
BH3 interacting domain death agonist	<b>Bid</b>
apoptosis inducing factor	<b>AIF</b>
Endonuclease G	<b>Endo G</b>
Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand	<b>Trail</b>
B-cell lymphoma 2	<b>Bcl-2</b>
Bcl-2-associated protein xL	<b>Bcl-xL</b>
Caspase activated DNase	<b>CAD</b>
Inhibitor of Caspase activated DNase	<b>ICAD</b>
Death inducing signaling compls	<b>DISC</b>
Bcl2 homology domain	<b>BH</b>
Response Evaluation Criteria In Solid Tumors	<b>RECIST</b>
Complete Response	<b>CR</b>

Partial Response	<b>PR</b>
Progressive Disease	<b>PD</b>
Stable Disease	<b>SD</b>
Computed tomography	<b>CT</b>
Magnetic resonance imaging	<b>MRI</b>
World Health Organization	<b>WHO</b>
Inhibitors of apoptosis proteins	<b>IAPs</b>
Cysteine-dependent aspartate-specific protease	<b>caspase</b>
c-Jun N-terminal kinase	<b>JNK</b>
Extracellular signal-regulated kinases	<b>Erk</b>
X-linked inhibitor of apoptosis	<b>XIAP</b>
IAP Binding Motif	<b>IBM</b>
Mitochondrial targeting sequence	<b>MTS</b>
Tumor, node ,metastasis	<b>TNM</b>
Digital rectal examination	<b>DRE</b>
Prostate specific antigen	<b>PSA</b>
Transrectal ultrasonography	<b>TRUS</b>
Transurethral resection of bladder tumor	<b>TURBT</b>

# الدراسة النظرية

## مقدمة Introduction:

يُعد السرطان من أهم الأمراض المسببة للوفاة في جميع أنحاء العالم، حيث سُجل ما يقارب 14 مليون حالة إصابة جديدة و 8.2 مليون حالة وفاة في عام 2012 ومن المتوقع أن يرتفع عدد الإصابات بمعدل 70 % خلال العقدين القادمين. والسرطان مصطلح يستخدم للتعبير عن أمراض تتولد فيها خلايا شاذة وتنقسم بدون ضوابط، وتكون قادرة على غزو أجزاء أخرى من الجسم<sup>(١)</sup>.

وقد كان عدد الوفيات الكلي المتوقع بأمراض السرطان في عام 2014 في دول الاتحاد الأوروبي حوالي 1.323600 مريض<sup>(٢)</sup> بينما كان حوالي 1.314236 مريض في عام 2013 أي أن العدد في ازدياد مع مرور الوقت، ويعد سرطان الرئة هو المسبب الأول للوفاة بالسرطان عند الذكور بنسبة 37% يليه سرطان البروستاتة بنسبة 11%، بينما يعد سرطان الثدي هو المسبب الأول للوفاة عند الإناث بنسبة 15 % يليه سرطان الرئة بنسبة 14% حيث من المتوقع في السنوات القادمة أن يكون سرطان الرئة هو المسبب الأول للوفاة بالسرطان عند كلا الجنسين<sup>(٣)</sup>.

وأما بالنسبة لواقع السرطان في بلدنا ومنطقتنا العربية، فوفقاً لإحصائيات منظمة الصحة العالمية فقد احتل السرطان المركز الثالث بين أسباب الوفيات بعد الأمراض القلبية الوعائية والأذيات في سورية<sup>(٤)</sup>، وتشير بعض الدراسات أيضاً إلى أن سرطان الرئة والبروستاتة والمثانة تحتل المراتب الأولى بين الذكور في منطقتنا العربية بينما يحتل سرطان الثدي والرئة مراتب متقدمة عند النساء<sup>(٥)(٦)(٧)(٨)</sup>.

ورغم كل الجهود المبذولة للتخلص من هذا المرض، لم تعط المعالجات الكيميائية أو الهرمونية أو الشعاعية نتائج مرضية بدليل ارتفاع عدد الاصابات والوفيات والتوقع الدائم للمزيد من هذا الارتفاع. لذلك يبقى السرطان من أكثر الأمراض إثارة للقلق والخوف مما جعله هدفاً للأبحاث والدراسات في مختلف أنحاء العالم بغية فهم طبيعته بصورة أفضل وإمكانية تطوير طرق علاجية أو وقائية فعالة للتخفيف من أثره على البشرية.

ونظراً للكلفة الاقتصادية الكبيرة التي يتحملها الوطن في معالجة مرضى السرطان في بلدنا، فقد حتم علينا هذا الأمر إجراء أبحاث متكاملة وجدية حول هذا الموضوع.

وكما نعلم تلعب الإستماتة دوراً هاماً في المحافظة على التعداد الخلوي الطبيعي ضمن الأنسجة، وبالتالي الوقاية من حدوث السرطان. حيث تعمل معظم العوامل العلاجية المضادة للسرطان على تفعيل حدوث الاستماتة وتقليل الورم لذلك سوف يؤدي الخلل في هذه العملية إلى مقاومة للدواء وفشل في المعالجة<sup>(٩)</sup>.

وتوجهت الأبحاث مؤخراً إلى دراسة دور بروتينات الاستماتة سواء في تحديد مرحلة الورم أو في الاستجابة للمعالجة المطبقة على السرطان، ومنها بروتين Smac/DIABLO الذي يلعب دوراً أساسياً في تحريض الاستماتة بسبيلها الداخلي بارتباطه مع مثبطات بروتينات الاستماتة وإلغاء فعاليتها<sup>(١٠)</sup>.

وقد عمدت العديد من المجموعات البحثية إلى دراسة دور هذا البروتين عند مرضى السرطان على مستوى الخزع النسيجية، إلا أننا من المجموعات التي ستدرس Smac/DIABLO على المستوى المصلي، وذلك بهدف محاولة إيجاد طريقة سهلة وقابلة للتطبيق من أجل إيقاف المعالجة الغير فعّالة مبكراً وتجنيب المريض للتعرض الغير ضروري للتأثيرات الجانبية الناتجة عن الأدوية.

ونظراً لعدم نوعية Smac/DIABLO لسرطان معين، فقد تم اختيار نوعين من الأمراض السرطانية المنتشرة في منطقتنا العربية وفقاً للدراسات الإحصائية المنشورة، حيث تمت الدراسة على سرطان البروستاتة وسرطان المثانة.

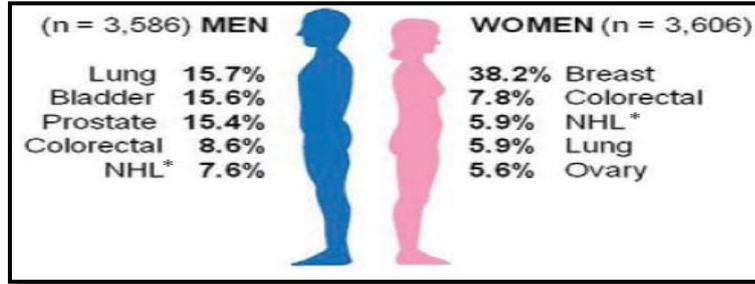
الفصل الأول : سرطان

البروستاتا

Prostate Cancer

## ١-١ الوبائيات Epidemiology

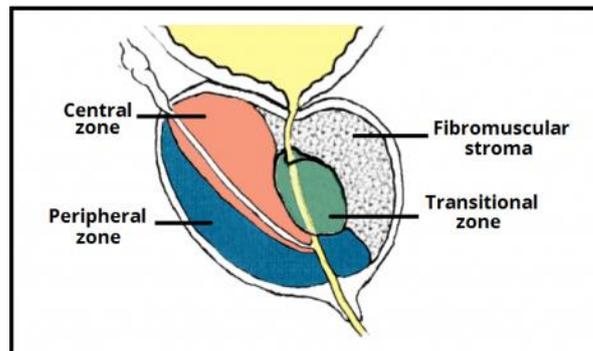
يُعد سرطان البروستاتة ثاني سرطان مسبب للوفاة بين الرجال في الولايات المتحدة الأمريكية بعد سرطان الرئة، أما في بلدن العالم الثالث فهو يحتل المرتبة السادسة بين السرطانات المنتشرة عند الرجال <sup>(٦)</sup> بينما يحتل المرتبة الثالثة في لبنان بعد سرطاني المثانة والرئة <sup>(٧)</sup>.



الشكل (١): نسب انشار السرطانات في لبنان عام ٢٠١٠

## ٢-١ غدة البروستاتة Prostate gland

البروستاتة عبارة عن غدة توجد عند الرجال فقط وتتوضع أمام المستقيم وفي أسفل المثانة، تقوم هذه الغدة بصنع سائل يحمي ويغذي خلايا النطاف كما يوجد خلف البروستاتة غدد تدعى الحويصلات المنوية seminal vesicles والتي تنتج معظم السائل المنوي، ويجتاز الإحليل في منتصف البروستاتة. تتألف البروستاتة من ثلاث مناطق وهي المنطقة المركزية التي تحيط بالقنوات الدافقة، والمنطقة الانتقالية التي تتوضع مركزياً وتحيط بالإحليل، والمنطقة المحيطة التي تشكل الجسم الرئيسي للغدة والقريبة من المستقيم.



الشكل (٢): غدة البروستاتة ومناطقها

يختلف حجمها وفقاً للعمر حيث تكون عند الشباب بحجم حبة الجوز وتصبح أكبر عند التقدم بالعمر. وهذا التضخم يمكن أن يكون ذو منشأ سرطاني مسبباً سرطانة غدية adenocarcinoma أو فرط تنسج حميد، حيث تسمح الغدة عندما تكون بحالتها الطبيعية بمرور البول بشكل طبيعي عبر الإحليل بينما عندما تكون متضخمة في حال السرطان أو فرط التنسج تعيق مرور البول لذلك تتشابه الحالتين في الأعراض والتي أهمها صعوبة وعسر في التبول (١١).

### ٣-١ أعراض سرطان البروستاتة Prostate cancer symptoms

قد تظهر بعض الأعراض عندما تبدأ الكتلة الورمية بالنمو ولكنها تكون غير نوعية ومن أهمها صعوبة وألم في التبول، تبول متكرر خصوصاً في الليل، دم في البول أو السائل المنوي، وألم في الظهر وأثناء الدفق ejaculation. وقد يعاني المريض من جميعها أو عدد منها. (١٢)

### ٤-١ عوامل الخطورة Risk factors

يُعد العمر من أهم عوامل الخطورة حيث يزداد تشخيص سرطان البروستاتة مع التقدم بالعمر اعتباراً من عمر ٥٠ عاماً مقارنة مع الأعمار الأصغر، كما تلعب القصة العائلية والوراثة دور مهم فحوالي ٢٥% من المرضى المصابين بسرطان البروستاتة لديهم أقرباء مصابين بالمرض، إضافة إلى عوامل أخرى تشمل العرق والنمط الغذائي والبدانة. (١٣)

### ٥-١ تشخيص سرطان البروستاتة Prostate cancer diagnosis

تشمل الأدوات التشخيصية الأساسية في سرطان البروستاتة فحص المس الشرجي DRE ومعايرة قيمة PSA. ولكن تبقى الأداة الأهم لتحديد وجود تسرطن في غدة البروستاتة هي الخزعة biopsy بواسطة التشريح المرضي التي تحدد التشخيص بالإضافة إلى درجة السرطان grade of cancer وامتداد الورم extent of the tumor. (١٣)

#### ١-٥-١ فحص المس الشرجي (DRE (Digital rectal examination)

تتوضع معظم سرطانات غدة البروستاتة في المنطقة المحيطة peripheral zone للغدة ومن الممكن تحريها بواسطة المس الشرجي عندما يتجاوز حجم الورم 0.2 مم. يتم هذا

الفحص من قبل الطبيب المختص الذي يدخل إصبع يده في المستقيم ليحس سطح غدة البروستاتة، حيث أن المنطقة من الغدة الملامسة لجدار المستقيم هي المنطقة الأشيع لنشوء السرطانات.

قد تدل ملاحظة وجود قساوة hardness على وجود تسرطن، ولا يجب استبعاد وجود سرطان عندما تكون نتيجة الفحص طبيعية، لأن العديد من الكتل السرطانية قد تنمو ولا يتم كشفها بالمس الشرجي لذلك يتم اجراء اختبارات أخرى للتحري.<sup>(١٤)</sup>

### ٢-٥-١ معايرة المستضد النوعي للبروستاتة (PSA (Prostate specific antigene)

هو عبارة عن بروتين سكري يتم إفرازه في السائل المنوي من الخلايا الظهارية البروستاتية سواء الطبيعية أو المفرطة التنسج أو السرطانية تتسرب منه كمية قليلة في الحالة الطبيعية إلى المجال خارج الخلوي ومنه إلى الدوران ولكن تتزايد تراكيزه في الدوران عندما تتخرب بنية أنسجة البروستاتة في حالة التسرطن.<sup>(١٥)</sup>

وقد أقرته منظمة إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA في العام ١٩٩٤ كواصم لتحري سرطان البروستاتة محددة القيمة 4.0 ng/ml الحد الأعلى للقيم الطبيعية حيث تختلف هذه القيمة تبعاً للعمر ويمكن أن تصل إلى 5.5 ng/ml لدى الذكور فوق عمر ٧٠ عاماً وتبقى ضمن الحدود الطبيعية.<sup>(١٦)</sup>

### ٣-٥-١ الخزعة Biopsy

إن التأكيد الوحيد لتشخيص التسرطن يكون من خلال فحص التشريح المرضي لأنسجة البروستاتة. ويطلب القيام بهذا الفحص عند وجود أي من الحالات التالية:

- تكون قيمة PSA أعلى من ٤ نانوغرام/مل.
- يكون هناك ارتفاع كبير في قيمة PSA بين اختبار وآخر يليه.
- يكون فحص المس الشرجي غير طبيعي.

ويتم هذا الفحص بعدة طرق أكثرها شيوعاً هو خزعة البروستاتة الموجهة بتخطيط الصدى عن طريق المستقيم (TRUS (Transrectal ultrasonography)، ويحدد التشريح المرضي بالإضافة إلى التشخيص درجة السرطان grade of cancer ومرحلة الورم stage of tumor.<sup>(١٧)</sup>

### ١-٣-٥-١ درجات السرطان Cancer grades

يعد تحديد "درجة السرطان" من أكثر العوامل أهمية من أجل التنبؤ بالاستجابة للعلاج والبقاء survival. فعندما يكون السرطان عدواني جداً تكون الخلايا عالية الخطورة high-grade ومختلفة بشكلها كلياً عن خلايا النسيج الطبيعية حيث تكون قليلة التمايز poorly differentiated، أما الخلايا المنخفضة الخطورة low-grade أو المتميزة جيداً well-differentiated فهي تختلف عن الخلايا الطبيعية ببعض النقاط الأساسية فقط.

الدرجة ١: Grade 1 تكون الخلايا السرطانية متميزة وبنيتها طبيعية نسبياً ومجمعة في كتلة مكتنزة compact mass.

الدرجة ٢: Grade 2 ما تزال الخلايا السرطانية متميزة ولكن يصبح تجمعها شاذ، وقد تغزو بعض الخلايا الأنسجة المجاورة أحياناً.

الدرجة ٣: Grade 3 تكون الخلايا متميزة وتجمعها شاذ جداً، وتغزو العديد من الخلايا الأنسجة المجاورة. هذه الدرجة هي الأكثر مشاهدة في عينات الخزعات للتشريح المرضي.

الدرجة ٤: Grade 4 تكون الخلايا قليلة التمايز وتغزو الأنسجة المحيطة بشكل متزايد.

الدرجة ٥: Grade 5 تكون الخلايا مشوهة بشكل كبير كأنها تنصهر معاً ولا تشبه الخلايا الطبيعية أبداً. ولا تتجمع بشكل عناقيد منتظمة

إن النظام الأكثر شيوعاً في تحديد درجات سرطان البروستاتة هو مقياس غليسون Gleason score حيث تعطى الخلايا السرطانية علامات يتم تحديد قيمتها بناءً على المعايير التالية: (١) شكل الخلايا السرطانية (٢) تجمع الخلايا السرطانية معاً. ويعطى كل معيار من هذه المعايير قيمة من ١ إلى ٥، وبجمع الرقمين نحصل على قيمة غليسون، أي أن مقياس غليسون يحدد برقم يتراوح بين ٢ إلى ١٠، يكون الرقم ٢ هو الأقل عدوانية aggressive بينما يكون الرقم ١٠ هو الأكثر عدوانية.<sup>(١٨)</sup>

### ١-٣-٥-٢ مراحل السرطان Cancer stages

حيث يتم التصنيف وفقاً لنموذج (TNM) المعتمد من قبل the American Joint Committee on Cancer (AJCC)

T: tumor يعتمد على حجم الورم الذي يعبر عنه برقم من ٠ إلى ٤ يزداد بزيادة حجم الورم.

T1: يكون الورم متوضع في غدة البروستاتة على نطاق ضيق.

T2: يكون الورم متوضع ضمن الغلاف البروستاتي.

T3: يتجاوز الورم الغلاف البروستاتي.

T4: ينتشر الورم إلى الأعضاء المجاورة

N: node العقد اللمفية.

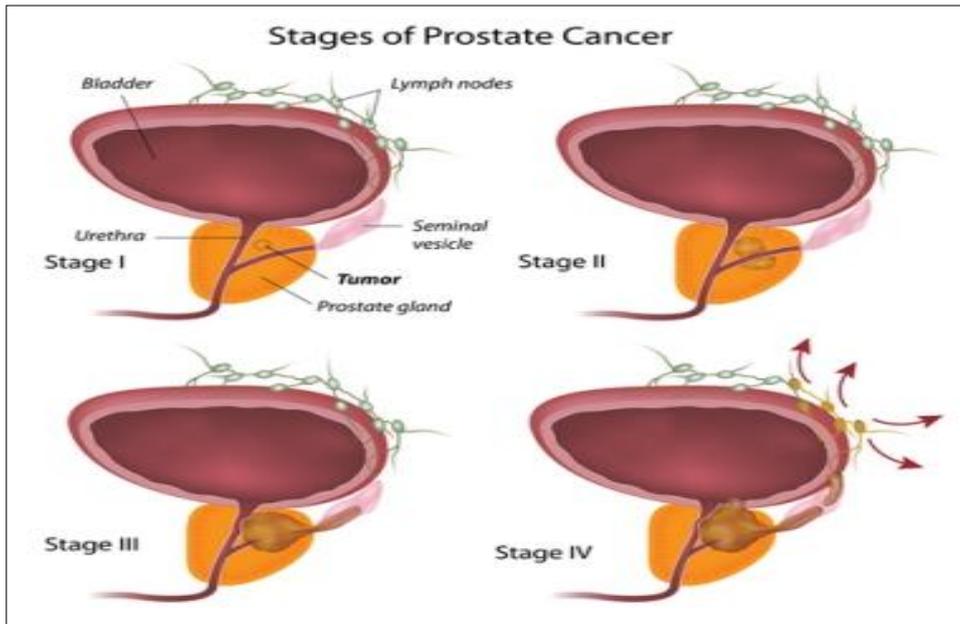
N0: يدل على أن العقد اللمفية سليمة.

N1: ينتشر الورم إلى العقد اللمفية في الحوض.

M: metastasis النقائل

M0: لا يوجد نقائل.

M1: يوجد نقائل حيث ينتشر خارج منطقة الحوض إلى الرئة والعظام وغيرها.<sup>(١٩)</sup>



الشكل (٣): مراحل سرطان البروستاتة

## ٦-١ معالجة سرطان البروستاتة Treatment of prostate cancer

يوجد عدة احتمالات للمعالجة حيث يتم اختيار المعالجة بناءً على عدة عوامل من أهمها عمر المريض ومدة حياته المتوقعة، حجم الورم وإذا كان موضعي في الغدة Localized prostate cancer أو متقدم Advanced أو في حال وجود نقائل.

### ١-٦-١ المعالجة الجراحية واستئصال البروستاتة Prostatectomy

يعتبر المرضى الأمثل لهذا النمط من العلاج هم الذين في مراحل T1 و T2 حيث من النادر أن يطبق هذه المعالجة على مرضى مراحل T4 المتقدمة أو النقائل. ويمكن أن تتشارك هذه المعالجة مع المعالجة الهرمونية أو الإشعاعية عند المرضى عالي الخطورة. (٢٠)

### ٢-٦-١ المعالجة الإشعاعية Radiation therapy

تستخدم هذه الآلية أشعة عالية الطاقة تقتل الخلايا السرطانية ويمكن أن تُستخدم كمعالجة بدئية عند مرضى الدرجة المنخفضة low grade من السرطان والتي تكون محتجزة ضمن الغدة، وكذلك كجزء من المعالجة الأولية (مترافقة مع المعالجة الهرمونية) للحالات التي انتشر فيها السرطان خارج غدة البروستاتة إلى الأنسجة القريبة، وأيضاً من الممكن استخدامها في حال لم يتم التخلص من السرطان بشكل كامل بعد الجراحة. (٢١)

### ٣-٦-١ المعالجة بالبرودة Cryosurgery

وهي تقنية يُحقن فيها غاز النيتروجين السائل بواسطة إبر تُغرس في الجلد الواصل بين فتحة الشرج ووعاء الخصيتين لتصل إلى البروستاتة، مما يسمح بعبور هذه الغازات الباردة مشكلة فقاعات متجمدة تعمل على تخریب خلايا البروستاتة السرطانية. وهي غالباً ما تستخدم لمعالجة المراحل المبكرة من السرطان اعتماداً على تقنية التجميد. (٢٢)

### ٤-٦-١ المعالجة الهرمونية Hormone therapy

والتي تهدف إلى تقليل مستويات الهرمونات الذكورية (الأندروجينات) في الجسم أو منعهم من الوصول إلى خلايا البروستاتة السرطانية.

ويعد التستوسترون و دي هيدرو تستوسترون من الأندروجينات الأساسية التي تُصنع في الخصيتين وتعرض خلايا البروستاتة على النمو لذلك فإن انخفاض مستوياتها سيجعل البروستاتة تنقلص أو تنمو بشكل بطيء جداً، وغالباً ما تستخدم في حال فشل المعالجات الأخرى أو بالمشاركة معها أو في حال كون المرضى لديهم مستوى PSA مرتفع بشكل كبير وعالي الخطورة وأحياناً قليلة قبل المعالجة الإشعاعية لتقليل حجم الورم. (٢٣)

ولدينا عدة أنماط من المعالجة الهرمونية وهي:

- الخشاء الجراحي surgical castration: وعلى الرغم من كونه عمل جراحي لكن الأثر الرئيسي له هو شكل من أشكال معالجة هرمونية حيث يعمل الجراحون على استئصال الخصيتين اللتان هما مكان تصنيع الأندروجينات.
- مضاهئات هرمون Luteinizing hormone-releasing LHRH hormone: تعمل هذه الأدوية على إنقاص كمية التستوسترون المصنعة من قبل الخصيتين وهي عبارة مواد تحقن تحت الجلد أو غرسات صغيرة تزرع تحت الجلد تؤدي بداية إلى ارتفاع بسيط في مستوى التستوسترون قبل أن ينخفض إلى مستويات منخفضة، ومن أهم هذه الأدوية (Zoladex®) goserelin.
- مضادات الأندروجين anti androgens: والتي تعمل على منع الجسم من استخدام الأندروجينات ومن أهم ادوية هذه المجموعة (Eulexin®) flutamide و (Casodex®) bicalutamide ويمكن أن تستخدم هذه الأدوية بالمشاركة مع مضاهئات LHRH كخط علاجي هرموني أول. (٢٤)

#### ١-٦-٥ المعالجة الكيميائية Chemoherapy:

والتي تستخدم أدوية مضادة للسرطان تُحقن في الوريد أو تعطى فمويًا، حيث تدخل إلى المجرى الدموي بشكل سريع مما يجعلها فعالة في حالة وجود النقائل وانتشار السرطان إلى الأعضاء البعيدة، ولا تعتبر هذه المعالجة خيار جيد في المراحل المبكرة من المرض ولكن بحثت بعض الدراسات فيما إذا كان استخدامها فعالاً ومفيداً لفترة قصيرة بعد الجراحة، حيث تعطى هذه الجرعات الكيميائية بفواصل زمنية محددة تدعى الدورات cycles يفصل بينها فترة راحة تسمح للجسم بأن يتعافى بها وتدوم كل دورة عدة أسابيع. (٢٥)

ومن هذه الأدوية (Taxotere®) Docetaxel و Doxorubicin و (Adriamycin®) و (Taxol®) Paclitaxel و (Paraplatin®) Carboplatin وفي معظم الحالات يُعد دواء docetaxel هو الخط العلاجي الأول من بين الأدوية الكيميائية لمرضى سرطان البروستاتة وفي حال فشله يتم اللجوء إلى دواء (Jevtana®) Cabazitaxel وقد اظهرت هذه الادوية انها تساعد في إطالة العمر عدة شهور وإبطاء نمو السرطان وتقليل أعراض المرض. (٢٦)

الفصل الثاني : سرطان

المثانة

Bladder Cancer

## ٢-١ الوبائيات Epidemiology

يشكل سرطان المثانة حوالي ٤% من مجمل السرطانات في أنحاء العالم، ولكن يحتل مرتبة متقدمة في منطقتنا العربية حيث يحتل المرتبة الأولى في مصر<sup>(٥)</sup> والمرتبة الثانية في لبنان بعد سرطان الرئة<sup>(٧)</sup>.

## ٢-٢ المثانة Bladder

المثانة عبارة عن عضو عضلي له شكل البالون يقوم بتخزين البول إلى حين طرحه خارج الجسم. يخرج البول من الكليتين إلى المثانة عن طريق أنابيب تدعى الحوالب ويُفرغ بالتبول عن طريق الإحليل، وتساعد عضلة المثانة عملية التبول عن طريق التقلص الذي تقوم به لدفع البول خارجاً.

تشريحياً يتألف جدار المثانة من عدة طبقات: طبقة رقيقة تبطن الجدار تدعى الظهارة البولية ومن ثم طبقة رقيقة من الأنسجة الرخوة هي lamina propria وتحيط بها طبقة عضلية هي عضلة المثانة وتتغلف أخيراً بطبقة دهنية و ثم غلاف البريتوان المحيط بالأعضاء الداخلية<sup>(٢٧)</sup>.

## ٢-٣ أسباب سرطان المثانة وعوامل الخطورة

تُعد الطريقة التي يتطور بها سرطان المثانة غير معروفة بشكل كامل وبالرغم من ذلك فقد تم التعرف على عدد من المواد التي يمكن أن تؤدي إلى تطور السرطان وحدثه، أهمها المواد الكيميائية الصناعية والمواد الموجودة في السجائر وقد احتل التدخين بمفرده نسبة ٥٠% من كافة الأسباب المؤدية للسرطان في الولايات المتحدة بالإضافة إلى أن التعرض المهني الطويل للمركبات الكيميائية كالداهانات والمُحلات قد احتل نسبة ٢٠ - ٢٥% من أسباب سرطان المثانة.

تقوم الكليتين بترشيح المواد المسرطنة من المجرى الدموي لتخليص الجسم منها وبالرغم من ذلك فإن هذه المواد التي تبقى في المثانة ولو لفترة ساعة قد تتداخل مع الطبقة الداخلية للمثانة قبل إخراجها مما يعرض المثانة لخطورة الإصابة بالسرطان وخاصة عند المدخنين.

معظم سرطان المثانة يصيب طبقة الظهارة البولية الداخلية طبقة lamina propria بنسبة ٩٠% دون غزو للطبقة العضلية.

ومن هنا أتت عوامل الخطورة لهذا المرض للمدخنين والأشخاص الذين يتعاملون مع الأصبغة والمعادن والدهانات والمواد الكيميائية العضوية وكذلك الذين لديهم عداوى مزمنة كذلك هم تحت خطورة هذا المرض.<sup>(٢٨)</sup>

## ٢-٤ أعراض سرطان المثانة Bladder cancer symptoms

تعد البيلة الدموية من أهم الأعراض التي تظهر عند ٨٥ - ٩٠ % من مرضى سرطان المثانة وأحيانا قد توصف بأنها غير مؤلمة، وقد يظهر الدم بشكل مرئي في البول وأحيانا يكون غير مرئي ويحتاج لفحص تحت المجهر وفي حال وجوده يعتبر عامل إنذار محتمل للمرض ولا يجب تجاهله.

تشمل الأعراض الأخرى التبول المتكرر وألم عند التبول (عسر تبول).<sup>(٢٨)</sup>

## ٢-٥ تشخيص سرطان المثانة Bladder cancer diagnosis

- تصوير مقطعي محوسب خاص بالطريق البولي (CT urogram (computed tomography urogram).
- فحص البول تحت المجهر ومشاهدة الخلايا السرطانية التي انسلخت من بطانة المثانة.
- تنظير المثانة cystoscopy وهو عبارة عن إجراء يسمح برؤية داخل المثانة بشكل مباشر، حيث يطبق بداية مخدر موضعي ثم يقوم الطبيب بإدخال أداة تدعى منظار المثانة cystoscope عبر الإحليل إلى داخل المثانة مما يمكن الطبيب من فحص السطح الداخلي للمثانة لملاحظة علامات السرطان في حال وجوده وتحديد مظهره وحجمه وتوضعه.
- عند وجود التسرطن يتحول المريض للتخدير العام ويتم ادخال أداة عبر الإحليل تشبه منظار المثانة ولكنها تحوي عروة سلكية wire loop في نهايتها تسمى منظار القطع resectoscope للحصول على النسيج ومن ثم يتم إرسال هذه الخزعة إلى اختصاصي التشريح المرضي للفحص.<sup>(٢٩)</sup>
- ويعتمد تصنيف مراحل سرطان المثانة على مدى اختراق الورم لجدار المثانة وقد تم الاعتماد على نموذج التصنيف TNM المعتمد من قبل لجنة AJCC

American joint committee on cancer حيث تشير T إلى الورم كما

ذكرنا سابقاً وتصنف مراحل الورم إلى:

Ta: ورم حليمي غير غازي ( محجوز في الظهارة البولية).

T1: يغزو الورم منطقة lamina propria.

T2: يغزو الورم الطبقة العضلية.

T2a: يغزو الورم عضلة المثانة السطحية.

T2b: يغزو الورم عضلة المثانة العميقة.

T3a: يغزو الورم الطبقة الدهنية المحيطة بالمثانة.

T3b: يغزو الورم الطبقة الدهنية ويستمر لخلف المثانة.

T4: يغزو الورم الأعضاء القريبة كالبروستاتة والرحم والمهبل. (٣٠)

## ٦-٢ معالجة سرطان المثانة **Bladder cancer treatment**:

يعتمد اختيار نمط المعالجة المطبقة وفقاً لعمر المريض بالإضافة إلى مرحلة الورم ومدى حجمه أو انتقاله لأعضاء أخرى.

### ١-٦-٢ جراحة TURBT:

تعتمد هذه المعالجة على استئصال ورم المثانة عبر الإحليل transurethral resection of bladder tumor، وهي تشبه عملية تنظير المثانة حيث يتم إدخال أنبوب رفيع يحمل في نهايته منظار القطع عبر الإحليل ويتم إزالة النسيج الورمي به، ولكن هذه المعالجة تُعتبر فعالة فقط في المراحل الأولى والمبكرة من الورم. (٣١)

### ٢-٦-٢ المعالجة الكيميائية داخل المثانة Intravesical chemotherapy:

يتم في هذه المعالجة وضع الأدوية الكيميائية مثل Doxorubicin ضمن المثانة من خلال أنبوب رفيع مرن يدعى قسطرة، حيث تصل هذه الأدوية إلى الخلايا السرطانية في بطانة المثانة دون التأثير على خلايا أخرى لذلك تعتبر أيضاً فعالة في المراحل الأولى من الورم وعند مرضى Ta و T1. (٣٢)

### ٣-٦-٢ استئصال المثانة Cystectomy:

عندما يصبح السرطان غازياً وينتشر في الطبقات العميقة من جدار المثانة، يصبح من الضروري استئصال المثانة بشكل جزئي أو كلي حسب درجة انتشاره وذلك في حال فشل باقي المعالجات في السيطرة على تقدم الورم.<sup>(٣٣)</sup>

## ٤-٦-٢ المعالجة الكيميائية Chemotherapy:

بالإضافة للمعالجة الموضعية بالحقن الكيميائي ضمن المثانة فإن هناك مجموعة من الأدوية التي تعطى وريدياً أو فموياً بفواصل زمنية تدوم عدة أسابيع.

تُستخدم المعالجة الكيميائية في عدة حالات، فقد تستخدم لتقليص حجم الورم مما يجعل استئصاله أسهل وتعرف هذه المعالجة neoadjuvant كما يمكن أن تستخدم بعد الجراحة أو المعالجة الإشعاعية لمنع نمو خلايا السرطانية التي قد تبقى موجودة وتعرف بالمعالجة المساعدة adjuvant حيث تقلل من احتمالية حدوث نكس عند المريض.

كما تعد المعالجة الكيميائية المعالجة الرئيسية عند مرضى المراحل المتقدمة مثل T3 ومرضى النقائل T4.<sup>(٣٤)</sup>

ومن أهم الأدوية الكيميائية Doxorubicin ، Paclitaxel ، Carboplatine و Cisplatin.

الفصل الثالث : الاستماتة

Apoptosis

### ٣-١ مقدمة عامة

اكتشفت ظاهرة الاستماتة عام ١٩٣٧م وقد ظهر المصطلح Apoptosis لأول مرة من قبل العالم Kerr وزملائه في اسكتلندا عام ١٩٧٢م لوصف النمط الشكلي النوعي لموت الخلية، حيث لاحظ ظاهرة موت الخلية الواحدة single cell death التي ظهرت في خلايا ميتة لأنسجة سليمة، وقد جاء هذا المصطلح من مصدر يوناني مؤلف من قسمين ( apo = for و ptosis= falling) وذلك لوصف العملية الخلوية للموت الخلوي المبرمج<sup>(٣٥)</sup>.

تُعتبر الاستماتة عملية فيزيولوجية معقدة ومهمة للموت الخلوي المبرمج مما دفع العديد من الباحثين للتحري عن دورها في الأمراض البشرية كالسرطان وأمراض المناعة الذاتية ومعرفة الآلية التي تستخدمها الأنسجة في تنظيم حجمها وتركيبها، حيث يجب أن تكون كل الأنسجة قادرة على التحكم بشكل جيد بعدد خلاياها وحجم النسيج لحماية نفسها من الخلايا التي تهدد استنابها<sup>(٣٦)</sup>.

والاستماتة عبارة عن برنامج داخل خلوي منظم بشدة تقوم فيه الخلايا الخاضعة للموت بتفعيل أنزيمات تشدق دنا الخلايا والبروتينات النووية والهيولية ويقوم هذا البرنامج بتقليل الخلايا غير المرغوبة، وتُعد هذه العملية أساسية في التطور المُضغي والجنيني وإعادة بناء الأنسجة، وهي ضرورية في الحفاظ على العدد الضروري والكافي من الخلايا وخاصة في الأنسجة التي تملك معدل عالي من التكاثر مثل الظهارة المعوية، كما تلعب دوراً في الحفاظ على السير الصحيح للعملية المناعية حيث يجب أن يكون عدد الخلايا المناعية المفعلة مضبوط بشكل جيد ليستوعب الاستجابة الالتهابية.

وبالرغم من كل ما سبق، يُعد تكون الأورام Tumorigenesis من أهم العمليات التي تعبر بشكل دقيق عن حالة فقد التوازن imbalance بين موت الخلية وبين تشكل خلايا جديدة أو انقسامها وحدوث خلل في عملية الاستماتة والتي تؤدي إلى حدوث الأمراض السرطانية<sup>(٣٥)</sup>.

وقد لاحظ Kerr أن الخلايا الاستماتية تبدي معالم شكلية مختلفة ومتميزة عن الخلايا النخرية، وسوف نتحدث عنها بشكل مختصر.

### ٢-٣ التمييز بين الاستماتة Apoptosis والنخر Necrosis

يُعد النخر نمط من الموت الخلوي cell death ولكنه غير معتمد على الطاقة وهو عملية غير منظمة تُعرض بعوامل خارجية مرضية غالباً وتصيب مجموعة من الخلايا المجاورة، بينما تكون الاستماتة عملية منظمة للموت الخلوي المبرمج وتؤثر على خلية بمفردها (٣٧) حيث تبدي الخلايا الاستماتية واحد أو أكثر من المعالم الشكلية التالية:

- انكماش الخلية Cell shrinkage.
- تكثف الكروماتين Chromatin condensation
- التشدق النووي Nucleosomal fragmentation.
- فوران في الغشاء السيتوبلازمي Blubbing of the plasma membrane.

أما المعالم الكيميائية الحيوية لهذه الخلايا فهي:

- تشدق الدنا DNA fragmentation.
- تشطر البروتينات في مواقع معينة.
- زيادة نفوذ الغشاء المتقدري (٣٨).

بينما تتميز الخلايا النخرية بالمعالم الشكلية التالية:

- فقدان سلامة غشاء الخلية.
- تورم الخلية Cell swelling.
- تورم العضيات Organelle swelling.
- تشدق الدنا بشكل عشوائي.
- تمزق غشاء الخلية.
- تنتهي بتفكك كامل للخلية وهضمها من قبل البالعات الكبيرة (٣٩).

إن زيادة النفوذية المتقدريّة للخلايا المستموتة سوف تؤدي إلى تحرير طليعة بروتينات الاستماتة pro-apoptotic وبالتالي تشكيل الأجسام الاستماتية apoptotic bodies التي تُستهلك من قبل الخلايا المجاورة دون أن تسبب هذه العملية أي رد فعل التهابي ويقتصر التأثير على الخلية المفردة نفسها (٤٠).

بينما يقود الموت الخلوي بعملية النخر إلى تحرير جزيئات إشارة تنبه مستقبلات التعرف للبالعات الكبيرة والخلايا المتغصنة والخلايا القاتلة الطبيعية وسوف يترجم الجهاز المناعي هذه الاشارات على أنها خطر يهدد حياة النسيج وبالتالي ستبدأ الاستجابة المناعية ورد الفعل الالتهابي<sup>(٤١)</sup>.

ومن أهم الأمراض المرتبطة مع تثبيط الاستماتة هي السرطان وأمراض المناعة الذاتية والعداوى الفيروسية<sup>(٤٢)</sup>، لذلك يُعد تفعيل هذه العملية طريقة مفاتيحية وطارئة لعلاج السرطانات وأمراض أخرى<sup>(٤٣)</sup>.

### ٣-٣ سبل الاستماتة Apoptosis Pathways

تظهر الاستماتة كاستجابة لمجموعة من المحرضات حيث أن هناك ثلاثة معالم تميز الاستماتة وهي: تشطر البروتين أو الحلمة، انهيار الدنا النووي وتعرف الخلايا البالعة على خلايا الاستماتة.

يظهر تشطر البروتينات أولاً مع تفعيل عائلة من بروتيازات السيستئين cysteine proteases تدعى الكاسبازات caspases وهي تُصنع بشكل غير فعال ثم تتفعل بآليات بدء نوعية وهي تلعب الدور المركزي في بدء شلال من الأفعال داخل خلوية والتي تؤدي نهاية إلى موت الخلية.

يوجد ثلاثة سبل يُمكن أن يبدأ فيها شلال caspase ومن ثم موت الخلية، ويعتمد تحديد السبيل المستخدم على:

● طبيعة إشارة الموت البدئية .

● نمط الخلية.

● التوازن بين كل من الاشارات المضادة للاستماتة وإشارات الاستماتة<sup>(٤٤)</sup>.

ويُعد كل من السبيلين الخارجي والداخلي المتقدي أكثر فهماً ووضوحاً في سبل الاستماتة، يليهما سبيل التنفيد.

### ٣-٣-١ السبيل الخارجي Extrinsic Pathway:

يبدأ هذا السبيل بتفعيل مستقبلات الاستماتة البدئية proapoptotic الموجودة على سطح الخلايا بواسطة جزيئات استماتية ولجائن ligands نوعية لهذه المستقبلات التي تسمى "مستقبلات الموت death receptors DRs".

تنتمي مستقبلات الموت للعائلة الكبيرة لمستقبل عامل النخر الورمي TNF ويُعد مستقبل Fas ومستقبل TNFR1 الأكثر أهمية ودراسة بين الأفراد، حيث يوجد Fas على سطح أنماط مختلفة للخلايا متضمنة الخلايا التائية والبائية وتضم اللجائن ligands التي تفعل هذه المستقبلات لجين fas (FasL) و TNF $\alpha$  بالإضافة إلى بعض اللجائن والمستقبلات المشابهة لها لكنها أقل دراسة من سابقتها وهي: Apo3L/DR3 و Apo2L/DR4 و Apo2L/DR5<sup>(٤٥)</sup>.

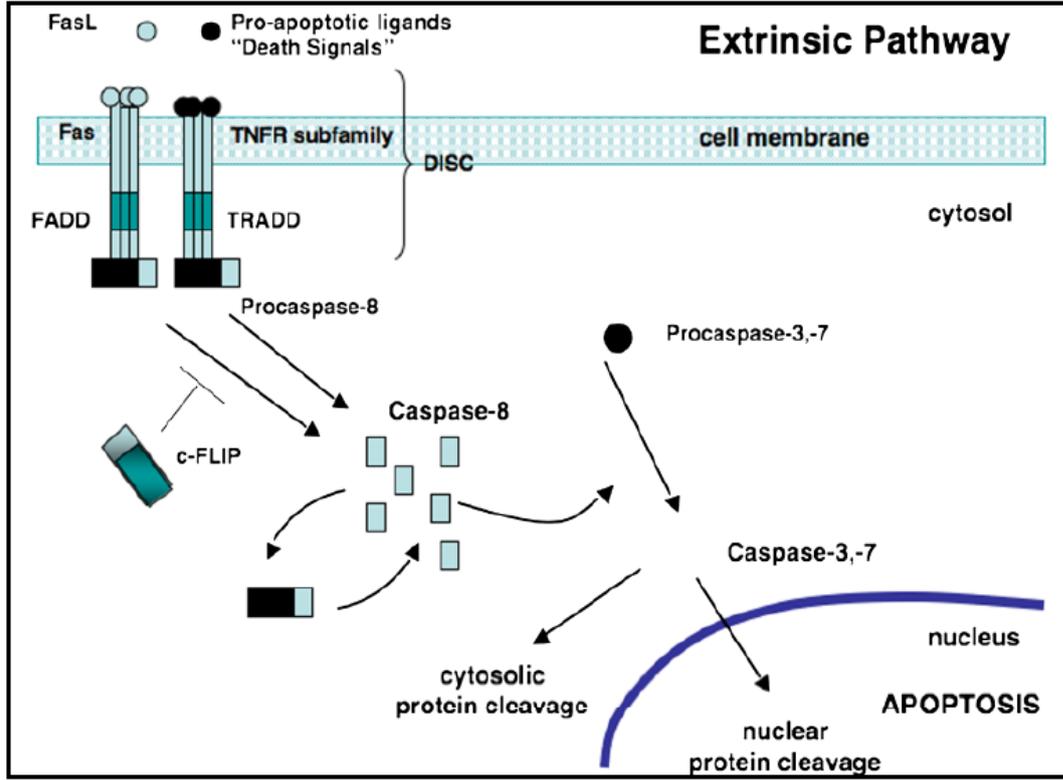
يُعرف القسم الداخل خلوي من مستقبل الموت بميدان الموت Death Domain DD وحالما تتجمع ثلاثة أو أكثر من اللجائن وترتبط مع مستقبلاتها سيتم توظيف البروتينات الواسلة ( اللؤمة ) adaptor protein والتي تُظهر ميادين موت موافقة ليتم ربطها مع المستقبلات ويكون كل بروتين واصل نوعي لمستقبل معين مثل FADD وهو ميدان الموت المرتبط بمستقبل Fas و TRADD ميدان الموت المرتبط بمستقبل TNF<sup>(٣٦)</sup>.

يرتبط FADD مع طليعة procaspase 8 وفي هذه النقطة يتشكل معقد الإشارة المحفّز للموت (DISC) Death inducing signaling complex الناتج من ارتباط لجين-مستقبل- بروتين مما ينتج عنه تحفيز ذاتي لطليعة procaspase 8 وتفعيل Caspase 8، وحالما يتم تفعيل Caspase-8 يتم تحريض الطور التنفيذي للموت وتفعيل Caspase-3 حيث تعتبر هذه النقطة نقطة تداخل والتقاء بين السبيلين الداخلي والخارجي للاستماتة.

ويمكن للاستماتة المتواسطة بمستقبل الموت أن تثبط عبر بروتين يدعى FLIP والذي سيرتبط إلى كلٍّ من FADD و Caspase-8 مما يجعلهما غير فعالين<sup>(٣٧)</sup>.

ويمثل الشكل (١) السبيل الخارجي لعملية الاستماتة، حيث ترتبط إشارات الموت ولجائن الاستماتة وFasL إلى مستقبلات الموت والتي يشكل القسم الداخلي منها ميادين الموت

DD، وبارتباط مستقبل-لجين-ميدان موت سوف يتشكل لدينا المكان الرابط للبروتين الواصل ومن ثم ينتج معقد لجين- مستقبل- بروتين واصل (DISC) الذي يفعل طليعة caspase-8 إلى caspase-8 الفعال، وستحرر الجزيئات الأنزيمية الفعالة إلى العصارة الخلوية وهنا يتفعل caspase-3 مما يؤدي إلى بدء الاستماتة.



الشكل (٤) (٣٦): رسم يمثل السبيل الخارجي لعملية الاستماتة

كما يظهر الجدول (١) مجموعة البروتينات المساهمة في هذا السبيل مع الاسم والوظيفة لكل منها.

الجدول (١): بروتينات السبيل الخارجي ووظيفتها

الوظيفة	الاسم	العامل
لجين يرتبط بمستقبل TNF $\alpha$	tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand اللجين المرتبط بعامل النخر الورمي المحفز للاستماتة	Trail
لجين يرتبط بمستقبل TNF $\alpha$	tumor necrosis factor عامل النخر الورمي ألفا	TNF $\alpha$

لجين يرتبط بمستقبل Fas تفعيل caspase-8-10 يشطر Bid لزيادة النفوذية الغشائية المتقدريية	Fas ligand لجين Fas death-inducing signaling complex معقد الإشارة المحفز للموت	Fas L DISC
بروتين واصل	TNFR1-associated death domain ميدان الموت المرتبط بمستقبل TNF	TRADD
بروتين واصل	Fas-associated death domain ميدان الموت المرتبط بمستقبل Fas	FADD
لجين يرتبط بمستقبل الموت	TNF-like WEAK inducer of apoptosis	TWEAK
لجين يرتبط بمستقبل الموت	nerve growth factor عامل النمو العصبي	NGF
يمنع caspase-8 من الارتباط مع مستقبلات الموت	FLICE-like inhibitory protien	c-FLIP
ينظم الوسائط المضادة للاستماتة مثل IAPs يسرع النمو يفعل الجينة المنظمة المضادة للاستماتة p65	nuclear factor-kB	NF-κB

### ٣-٣-٢ السبيل الداخلي المتقدري للاستماتة Intrinsic mitochondrial pathway:

يبدأ هذا السبيل من داخل الخلية استجابة لجهد خلوي كضرب جيني أو نقص التأكسج أو الاشعاع أو عوامل العلاج الكيميائي أو السيتوكينات وسيؤدي نهاية إلى تحرر بروتينات الاستماتة البدئية من المتقدرة والتي بدورها تقوم بتفعيل أنزيمات الـ caspases وتحريض الاستماتة<sup>(٤٦)</sup>.

يعتمد نجاح هذا السبيل في تحقيق الاستماتة على التوازن في الفعالية بين البروتينات الداعمة للاستماتة والبروتينات المضادة للاستماتة من عائلة Bcl-2 (B cell lymphoma2) وقد اشتق اسم هذه العائلة من كونها العضو الثاني من مجمل البروتينات التي وجدت في الورم اللمفي الجريبي follicular lymphoma، وتوجد جميع أعضاء هذه العائلة على الغشاء المتقدري الخارجي بشكل مثنويات dimers تضبط النفوذية

الغشائية عبر قناة شاردية أو من خلال تشكيل مسامات وتتحدد النفوذية من خلال تحرر بروتينات الاستماتة البدئية من المتقدرة أو عدم تحررها (٣٦).

تنقسم عائلة Bcl 2 إلى ثلاث مجموعات وفقاً للمعايير الوظيفية حيث تقوم المجموعة الأولى بحشد الفعالية المضادة للاستماتة فتسمى البروتينات المضادة للاستماتة بينما تقوم المجموعتان الثانية والثالثة بتحريض موت الخلية.

تضم المجموعة الأولى البروتينات المضادة للاستماتة مثل Bcl-2 و Bcl-xL والتي تعمل على ضبط النفوذية الغشائية للمتقدرة عن طريق تحفيز تحول ADP إلى ATP والمحافظة على استقرار الجهد الكموني الغشائي الداخلي المتقدري ومنع فتح مسام انتقالية، وتترافق زيادة التعبير عن Bcl-2 و Bcl-xL مع عدد من الأمراض الخبيثة عند الإنسان كما تقوم هذه البروتينات بتنشيط عمل المجموعتين الأخرتين اللتين تضمان بروتينات الاستماتة البدئية مثل Bak و Bax و Bad و Bid و Bim و Hrk (٤٧).

تبدأ بروتينات الاستماتة من عائلة Bcl-2 بالاستماتة بواسطة كبح فعالية البروتينات المضادة للاستماتة Bcl-2 و Bcl-xL عن طريق الارتباط مع مواقعها المتقدرية، أو بواسطة تحفيز فعالية بروتينات Bak و Bax. وأيضاً هناك نمط ثالث لفعالية بروتينات الاستماتة من خلال بروتين هيولي هو Bid حيث يوجد في الهيولى بشكل غير فعال ولكنه عندما ينشط بواسطة caspase-8 المفعّل القادم من السبيل الخارجي، سيتحول إلى tBid الذي يسبب تغير بنيوي في Bax مما يسمح له بعبور الغشاء المتقدري وتحريض تشكل القناة الشاردية لزيادة تحرر جزيئات الاستماتة.

ويُعد أساس هذا السبيل الداخلي هو زيادة النفوذية الغشائية المتقدرية وتحرر جزيئات الاستماتة مثل cytochrome-c إلى العصارة الخلوية، فبينما تقوم البروتينات المضادة للاستماتة بكبح تحرر cytochrome-c من المتقدرة تعمل بروتينات الاستماتة على تعزيز تحرره.

وحالما يتحرر cytochrome-c ويصل للهيولى، سوف يرتبط مع جزيء عُصاري خلوي يدعى العامل المفعّل للاستماتة -1 (Apaf-1 apoptosis activating factor-1) ثم يرتبطان إلى الطليعة 9-procaspase فيتشكل من هذه المواد الثلاثة صيغة تشبه

العنفود تدعى apoptosome وسيتم تفعيل caspase-9 والتي تقود نهاية إلى تفعيل caspase-3.

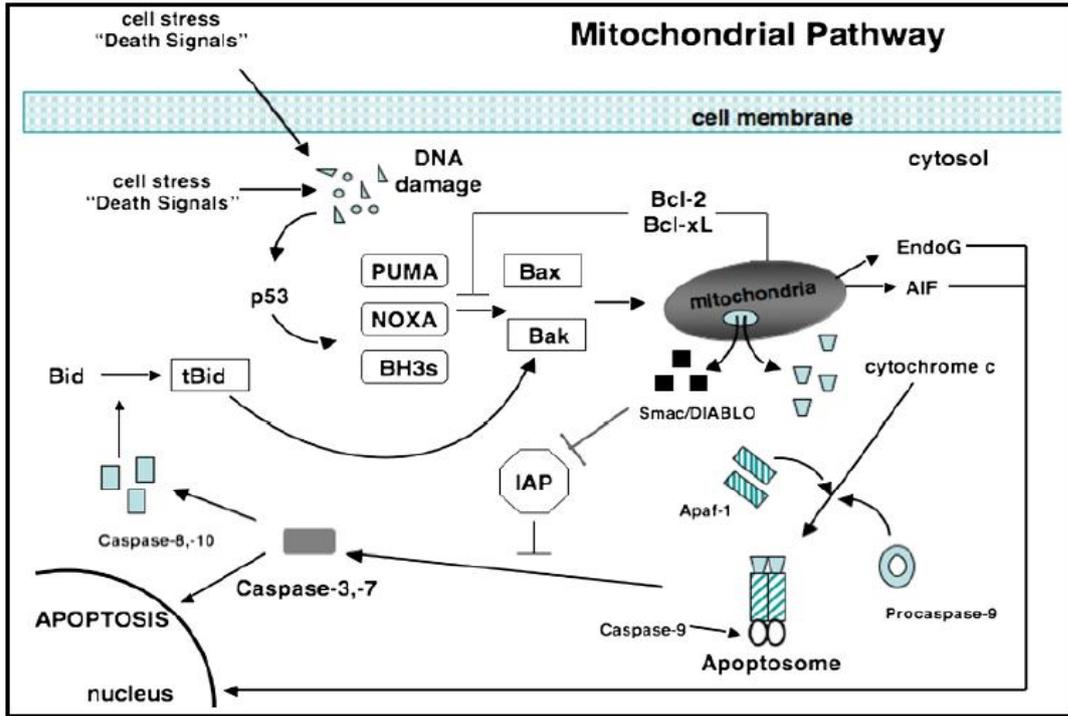
ومن العوامل الاستماتية التي تتحرر من المتقدرة إلى الهيولى نجد:

● Smac/Diablo ( Second mitochondria derived activator of caspase / Direct IAP binding with low pI ) ويُعرَف عنهما بأنهما يحفزان الإستماتة عبر الارتباط مع IAP (مثبطات بروتينات الإستماتة Inhibitors of apoptosis proteins) وتثبيط فعاليتها ومنع تداخلها مع caspase-3 أو caspase-9، وسنتحدث عن Smac/DIABLO بشكل مفصل أكثر خلال بحثنا هذا.

● (Apoptosis inducing factor) AIF العامل المحرض على الاستماتة الذي ينتقل إلى النواة ويسبب تشدق DNA.

● النوكلياز الداخلي G (Endonuclease G) الذي ينتقل أيضاً إلى النواة و يشطّر الكروماتين النووي ويؤدي لإنتاج شذف قصيرة من DNA.

ويلعب البروتين الكابح للورم P53 دوراً حاسماً في تنظيم بروتينات عائلة Bcl-2. وبكل الأحوال فإن الآليات الدقيقة لذلك لم يتم الكشف عنها بعد<sup>(٤٨)</sup>، ويمثل الشكل (٢) السبيل الداخلي لعملية الاستماتة.



الشكل (٥) (٣٦): يمثل السبيل الداخلي لعملية الاستماتة

كما يُظهر الجدول (٢) البروتينات المساهمة في هذا السبيل.

الجدول (٢): بروتينات السبيل الداخلي ووظيفتها

الوظيفة	الاسم	العامل
<b>المجموعة الأولى من عائلة Bcl-2 المثبطة للاستماتة</b>		
تتحكم بالنفوذية المتقدرية	B-cell lymphoma 2	<b>Bcl-2</b>
وتنشط Bax و Bak و P53	Bcl-2-associated protein xL	<b>Bcl-xL</b>
<b>المجموعة الثانية والثالثة من عائلة Bcl-2 المحرصة للاستماتة</b>		
ترتبط وتنشط Bcl-2	BCL2 interacting protein BIM	<b>Bim</b>
ترتبط وتنشط Bcl-2	BCL2 interacting killer	<b>Bik</b>
ترتبط وتنشط Bcl-2	BCL2 antagonist of cell death	<b>Bad</b>
ينشط بواسطة caspase-8 ويشكل tBid الذي يسبب تغير في Bax مما يسمح له بعبور الغشاء المتقدري كذلك ترتبط وتنشط Bcl-2	BH3 interacting domain death agonist	<b>Bid</b>

تفعل Bax مما يزيد النفوذية الغشائية	p53-upregulated modulator of apoptosis	<b>PUMA</b>
تفعل Bax مما يزيد النفوذية الغشائية	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	<b>NOXA</b>
	Bcl-2-associated protein x	<b>Bax</b>
	Bcl-2-associated protein k	<b>Bak</b>
<b>Mitochondrial factors</b> العوامل المتقدرية		
يحرص تكثف الكروماتين وتشدق الدنا ولا يعتمد على caspase	Apoptosis inducing factor	<b>AIF</b>
يحطم الدنا بطريقة غير معتمدة على caspases	Endonuclease G	<b>Endo G</b>
يرتبط بـ IAPs ويعديلها	Second mitochondrial-derived activator of caspases – director inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI	<b>Smac/DIABLO</b>
يرتبط بـ IAPs ويعديلها	high temperature requirement protein A2	<b>HtrA2/Omi</b>
ينقص من الجهد الكموني للغشاء المتقدري يرتبط مع pocaspase-9 و Apf-1 ليشكل apoptosome		<b>Cytochrome-c</b>

### ٣-٣-٣ سبيل Perforin/granzyme:

كجزء من سبيلي الاستماتة المعروفين (الداخلي والخارجي)، يوجد سبيل خارجي إضافي لتحفيز الاستماتة هو سبيل granzyme B وهو الأقل وضوحاً بين سبل الاستماتة.

تقوم الخلية التائية السامة بعد التعرف على المستضد على سطح الخلية الهدف بتحرير مكوناتها من الحبيبات الانحلالية والتي تقسم إلى قسمين: بروتينات البيروفورين Perforine proteins والبروتيازات المعروفة بـ granzymes.

Granzyme B هو عبارة عن إنزيم لمفاوي حبيبي lymphocyte granular enzyme يُعبر عنه بواسطة اللمفاويات التائية السامة المُفعّلة CTL والخلايا القاتلة الطبيعية NK<sup>(٤٩)</sup>.

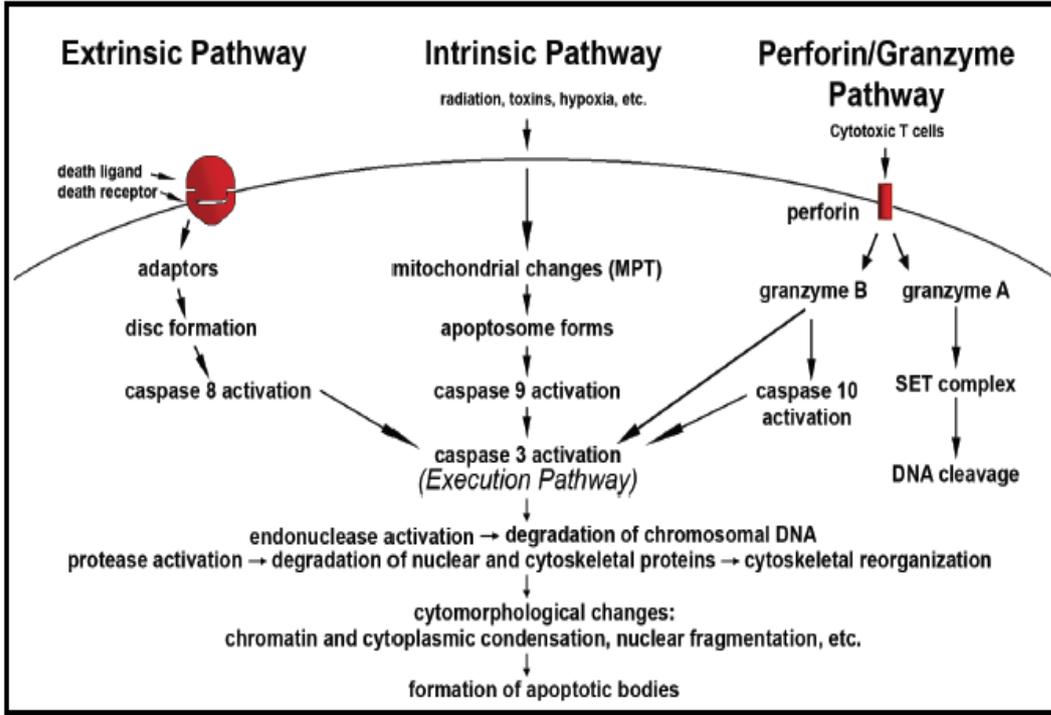
تُعتبر بروتيازات السيرين granzyme A و granzyme B من أكثر المكونات أهمية بين الحبيبات، حيث يقوم granzyme B بتفعيل طليعة procaspase-10 إلى caspase-10 كما يشتر عدة عوامل مثل ICAD (inhibitor of caspase activated DNase). وتشير الدراسات إلى أن granzyme B يمكن أن يستخدم السبيل الداخلي المتقدري لتضخيم إشارة الموت عبر شطر Bid وتحريض تحرر cytochrome-c، كما يمكنه أن يُفعل caspase-3 مباشرةً وبهذه الطريقة يمكن تخطي سبل الإشارة السابقة ويتم تحريض مباشر لسبيل التنفيذ للاستماتة.

بينما يعمل granzyme A بطريقة غير معتمدة على الـ caspases حيث يقوم بتحريض تمزق الدنا بواسطة DNase الذي يلعب دور مناعي هام في منع السرطان عن طريق تحريض استماتة الخلايا الورمية<sup>(٣٧)</sup>.

### ٣-٣-٤ سبيل التنفيذ Execution pathway:

يلتقي كلاً من السبيلين الداخلي والخارجي عند نفس النقطة، والتي هي طور التنفيذ الذي يعتبر السبيل النهائي للاستماتة، والذي يبدأ فيه تفعيل كاسبازات التنفيذ caspases execution التي تُفعل النوكلياز الهيولية الداخلية التي تدرك المادة النووية، وكذلك تفعل البروتيازات التي تدرك البروتينات النووية والخلوية الهيكلية. يرتبط CAD مع مثبطه ICAD ويشكل معقداً في الخلايا المتكاثرة مما يمنع تدرك DNA الخلية، بينما يقوم Caspase-3 المفعّل في الخلايا الخاضعة للاستماتة بشطر ICAD ليحرر CAD، ثم يقوم CAD المتحرر بتدرك الدنا DNA الصبغي الموجود داخل النواة مسبباً تكاثفاً للكروماتين ومن ثم تشكيل الأجسام الاستماتية apoptotic bodies<sup>(٥٠)</sup>.

ويُلخص لنا الشكل (٣) عملية الاستماتة بكافة سبلها.



شكل (٦) (٣٧): تقديم تمثيلي لأحداث الاستماتة

بعد الوصول إلى سبيل التنفيذ وتشدف الدنا، نصل إلى آخر مرحلة من الاستماتة وهي التعرف على الخلايا الميتة من قبل الخلايا البالعة، حيث تُظهر خلايا الاستماتة واصمات على غشائها تتعرف عليها البالعات. وينتقل الفوسفاتيديل سيرين وهو مركب شحمي فوسفوري من الطبقة الداخلية إلى الطبقة الخارجية للغشاء الهولي عبر إشارات داخلية خلوية، مما يسمح بالتعرف المبكر وإزالة الخلايا الميتة بدون تحرر وسائط التهابية كالتى تظهر في حال النخر (٣٦).

### ٤-٣ الاستماتة والسرطان Apoptosis and cancer

تُظهر الخلايا السرطانية سمة مميزة وهي انفصال موت الخلية عن انقسام الخلية، حيث لا تخضع الخلايا التي يجب أن تموت إلى الموت، وقد أشارت دراسات علم الأورام إلى أن تحسين عملية الاستماتة سوف يعيق نمو الخلايا الورمية.

تنتج بعض الأورام طفرات في جينة P53 وتغير من وظائفه حيث تؤدي هذه التغيرات إلى نقص الاستماتة وتطور الورم، بينما البعض الآخر يُظهر زيادة في التعبير عن بروتينات Bcl-2 المثبطة للاستماتة والتي تؤدي إلى توقف برنامج الموت الخلوي الطبيعي، وبعضها

يرجع إلى آليات أخرى مختلفة متعلقة بالبروتينات المثبطة للاستماتة ومثبطاتها مثل Smac/DIABLO والتي توجهت الأبحاث مؤخراً إلى دراسة الدور الذي تلعبه في آلية حدوث السرطان (٥٢).

يوجد عدة طرق تكتسب من خلالها الخلية الخبيثة قدرتها على مقاومة الإستماتة، وبشكل عام فإن الآليات التي تحدث خلال هروب الخلية من الإستماتة يمكن أن تقسم إلى:

١- خلل التوازن بين بروتينات الإستماتة البدئية والبروتينات المضادة للإستماتة.

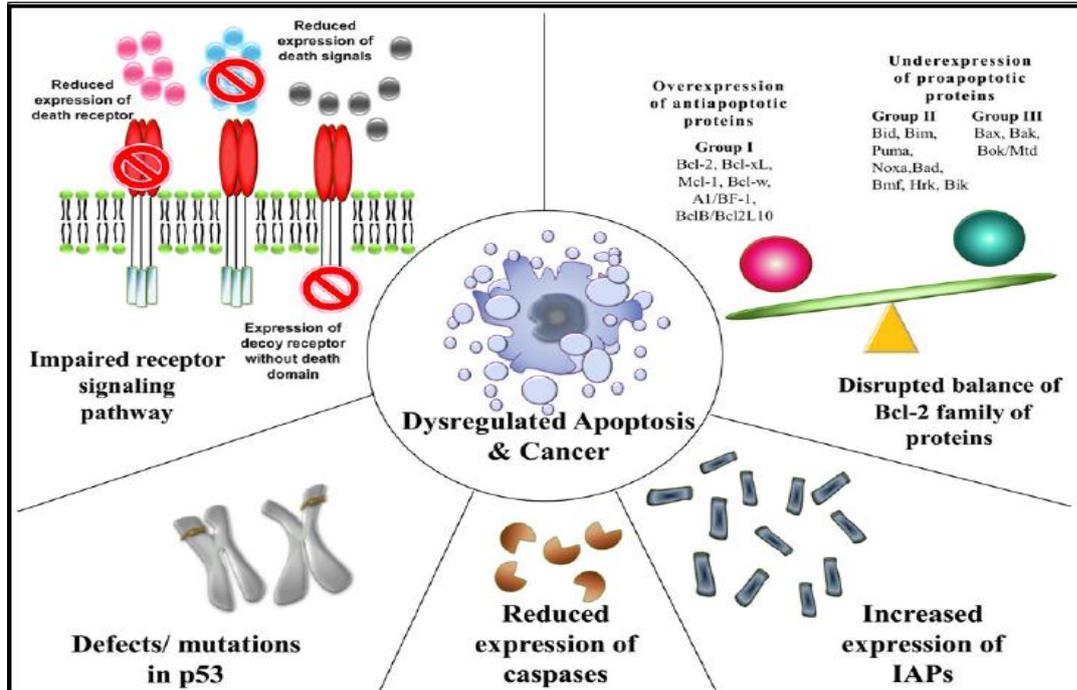
٢- زيادة التعبير عن مثبطات بروتينات الاستماتة IAPs.

٣- انخفاض فعالية Caspases.

٤- عيوب وطفرات في بروتين P53.

٥- ضعف إشارة مستقبل الموت death receptor signaling.

ويوضح الشكل (٤) مجموعة الآليات التي تساهم في الهرب من الاستماتة وحدث السرطان.



الشكل (٧) (٤٨): مجموعة من الآليات التي تساهم في الهروب من الإستماتة ونشوء السرطان

### ٣-٤-١ خلل التوازن بين بروتينات الإستماتة البدئية والبروتينات المضادة للإستماتة

تضم عائلة بروتينات Bcl-2 بروتينات مضادة للإستماتة anti-apoptotic proteins وبروتينات داعمة للإستماتة pro-apoptotic proteins وهي تلعب دوراً جوهرياً في تنظيم الإستماتة وخاصة عبر السبيل الداخلي على مستوى المتقدرة.

يمكن تقسيم أفراد عائلة Bcl-2 اعتماداً على الوظيفة والميادين المتماثلة التركيب (BH) Bcl-2 homology domains إلى ثلاثة مجموعات:

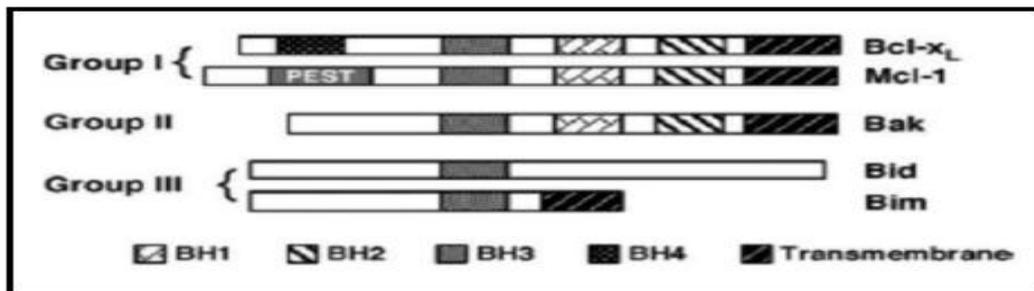
- تضم المجموعة الأولى البروتينات المضادة للإستماتة والتي تحتوي على كل ميادين BH الأربعة، وهي تحمي الخلية من منبهات الإستماتة و بعض الأمثلة على هذه البروتينات:

Bcl-2 و Bcl-xL و Mcl-1 و Bcl-w و A1/Bfl-1 و Bcl-B/Bcl2L10

- تضم أفراد المجموعة الثانية كلّ ميادين BH الأربعة وهي بروتينات استماتة بدئية وكأمثلة عليها: Bax و Bak و Bok/Mtd .

- تتألف المجموعة الثالثة فقط من بروتينات BH-3 وأطلق عليها هذا الاسم لأنه مقارنة مع باقي الأفراد فهي تقتصر على الميدان BH-3 وكأمثلة على هذه المجموعة: Bid و Bim و Puma و Noxa و Bad و Bmf و Hrk و Bik . وهي تعتبر بادئات لعملية الإستماتة ولذلك فهي من البروتينات البدئية.

عندما يحدث اختلال في التوازن بين البروتينات البدئية للإستماتة والبروتينات المضادة للإستماتة من عائلة Bcl-2 تكون النتيجة استماتة غير منظمة عند الخلايا المتأثرة وقد يكون السبب في ذلك فرط التعبير عن واحد أو أكثر من البروتينات المضادة للإستماتة أو كلا النوعين من البروتينات<sup>(٥٣)</sup>. ويمثل الشكل (٥) بنية بروتينات عائلة Bcl-2.

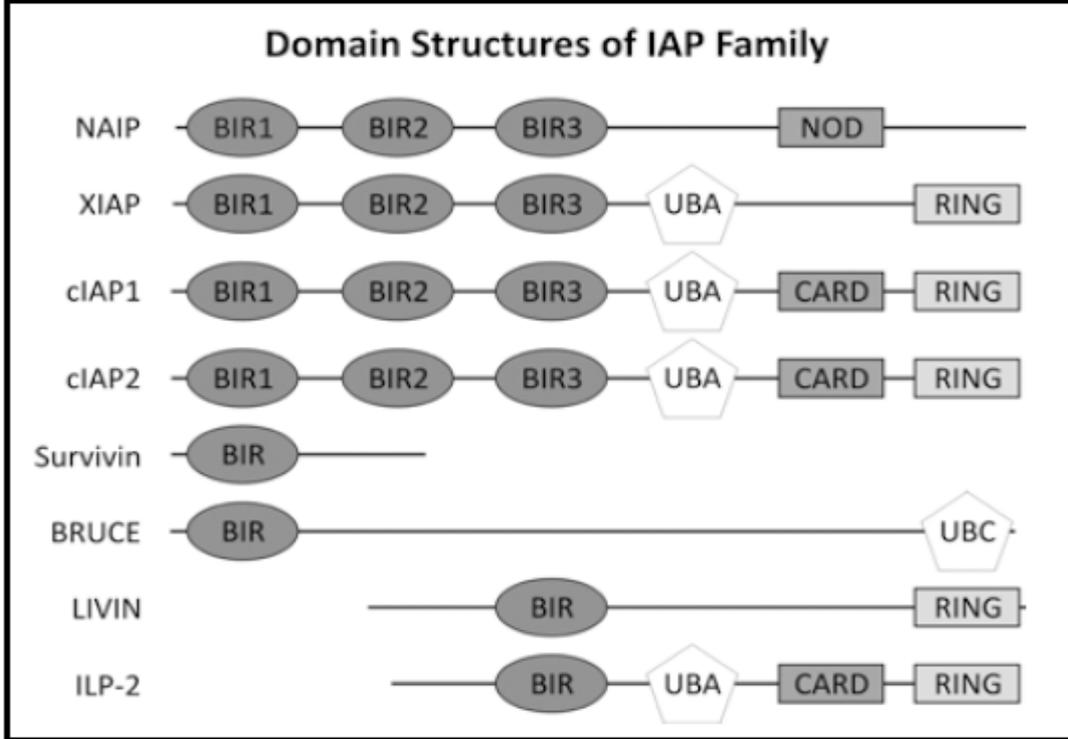


الشكل (٨) (٥٤): تقديم تمثيلي لأفراد عائلة Bcl-2

### ٣-٤-٢ زيادة التعبير عن مثبطات بروتينات الاستماتة IAPs

وهي مجموعة من البروتينات المتماثلة من الناحية الوظيفية و البنيوية والتي تعمل على تنظيم الإستماتة و تنبيغ الإشارة والحركة الخلوية. تتصف هذه البروتينات بوجود ميدان بروتيني متكرر مماثل لذلك الموجود عند الفيروسات العسوية يدعى Baculovirus IAP repeat (BIR) وتمّ حتى الآن تحديد ثمانية IAPs تُعرف باسم NAIP (BIRC1) و c-IAP1 (BIRC2) و c-IAP2 (BIRC3) و X-linked IAP (XIAP, BIRC4) و Survivin (BIRC5) و Apollon (BRUCE, BIRC6) و Livin/ML-IAP (BIRC7) و protein2(BIRC8).

تُعد بروتينات IAPs مثبطات Caspases وتستطيع أن تثبط فعاليتها من خلال ربط ميادين BIR إلى المواقع الفعالة من Caspases، أو من خلال تحفيز تدرك وتخراب Caspases الفعالة أو عبر إبقاء Caspases بعيدة عن ركائزها<sup>(٥٥)</sup>. ويمثل الشكل (٦) رسماً لبنية هذه البروتينات<sup>(٥٦)</sup>.



الشكل (٩) <sup>(٥٦)</sup>: تقديم تمثيلي لأفراد عائلة IAPs

### ٣-٤-٣ انخفاض فعالية Caspases:

تُعد Caspases من العوامل الهامة في ابتداء و تنفيذ الإستماتة ولذلك يعتقد أنّ المستويات المنخفضة منها أو فشلها في القيام بوظيفتها يكون مسؤول عن الانخفاض في حدوث الإستماتة وبالتالي حدوث السرطان.

تقسم caspases التي تلعب دوراً هاماً في الاستماتة إلى مجموعتين:

- البادئات initiator caspases (8 و 9 و 10) والتي هي مسؤولة بشكل أساسي عن بدء سبيل الإستماتة.
- المؤثرات (المُسْتَفْعِلَات) effector caspases (3 و 6 و 7) والتي هي مسؤولة عن التدرك الحقيقي للمكونات الخلوية خلال الإستماتة<sup>(٥٧)</sup>.

### ٣-٤-٤ عيوب وظفرات في بروتين P53

يعتبر بروتين P53 واحد من أكثر البروتينات الكابحة للورم شهرة، وقد تمّ التعرف عليه بدايةً عام 1979 كبروتين خلوي يتراكم في أنوية الخلايا السرطانية، و قامت العديد من الدراسات بالبحث عن وظيفته و دوره في السرطان حيث أنه لا يتدخل فقط في تحريض الإستماتة ولكنّه يلعب دوراً أساسياً في تنظيم الدورة الخلوية والتطور والتمايز وتضخيم المورثة و تأشيب الدنا DNA والشيخوخة الخلوية، وترتبط عيوب المورثة الكابحة للورم P53 بأكثر من 50% من أورام البشر<sup>(٥٨)</sup>.

### ٣-٤-٥ ضعف إشارة مستقبلات الموت

تعد مستقبلات الموت ولجانها عوامل أساسية في السبيل الخارجي للاستماتة وتمتلك هذه المستقبلات ميادين موت DD، وعندما تتحفز عبر إشارة الموت والتي هي عبارة عن عدد من الجزيئات التي ترتبط إلى مجال الموت، سوف ينتج تفعيل لشلال الإشارة.

ويمكن أن تؤدي العديد من الشذوذات في سبل إشارة الموت إلى الهروب من السبيل الخارجي للإستماتة ومن هذه الشذوذات الفشل في وظيفة المستقبل أو المستوى المنخفض في إشارات الموت وإنّ كلاً مما سبق يمكن أن يساهم في إشارات فاشلة و بالتالي انخفاض في الإستماتة<sup>(٥٩)</sup>.

### ٣-٥ تقييم استجابة الورم للمعالجة

عرّفت منظمة الصحة العالمية WHO عام 1979 م لأول مرة معايير استجابة الورم وقامت بنشرها عام 1981م لكي تُستخدم بشكل رئيسي في التجارب التي يكون فيها استجابة الورم هو النقطة النهائية الأساسية<sup>(٦٠)</sup>.

يتم تقدير حجم الورم بشكل تقليدي من القياسات ثنائية البعد bidimensional measurements وتحديد الاستجابة للمعالجة عبر تقييم تغير طول الخط الأساسي عبر المعالجة. وبالرغم من ذلك فقد برزت بعض الصعوبات في تحديد هذه المعايير وتفسير النتائج السريرية، مما دفع مجموعة من الباحثين إلى تبسيط هذه المعايير ووضعها بشكل أدق والتي نُشرت لأول مرة عام 2000 م وعرفت اختصاراً باسم RECIST (معايير تقييم الإستجابة في الأورام الصلبة Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)<sup>(٦١)</sup>.

وتُصنف الإستجابة للمعالجة وفق معايير RECIST كما يلي:

- الإستجابة الكاملة Complete Response CR : إختفاء كل الآفات الهدفية ويجب أن يحدث إنخفاض في المحور الأقصر عند قياس كل العقد اللمفية المرضية إلى أصغر من 10 ميلليميتر.
- الإستجابة الجزئية Partial Response PR : يحدث نقص على الأقل بحوالي 30 % في مجموع نصف القطر الأطول لكل الآفات الهدف.
- المرض المترق Progressive Disease PD : على الأقل زيادة 20 % في مجموع نصف القطر الأطول للآفات الهدف أو ظهور آفة واحدة جديدة أو أكثر.
- المرض الثابت Stable Disease SD : لا يوجد تغير ملحوظ في تضاول الورم أو في زيادته<sup>(٦٢)</sup>.

### ٣-٥-١ طرق قياس تقييم الاستجابة للمعالجة

يُفضّل أن يتم التقييم اعتماداً على التصوير أكثر من الفحص السريري إلا في حالة عدم القدرة على تصوير الآفة المرادة لذا نلجأ إلى تقييمها بالفحص السريري.

- التصوير المقطعي المحوسب CT والتصوير بالرنين MRI : يعتبر التصوير المقطعي المحوسب CT هو الطريقة الأفضل توافراً حالياً والقابلة أيضاً لإعادة ذلك لقياس آفات محددة لتقييم الإستجابة، ويعتمد الدليل الإرشادي في تحديد قابلية قياس الآفات اعتماداً على CT بافتراض أنّ سماكة مقطع CT يكون 5 ملم أو أقل. يُعتبر أيضاً استخدام التصوير بالرنين المغناطيسي MRI مقبول في حالات معينة مثل مسح كامل الجسم.
  - تصوير الصدر بالأشعة X : يُعد تصوير الصدر المقطعي المحوسب CT أفضل من التصوير بالأشعة X، حيث يُعتبر أكثر حساسية وخاصة في تحديد الآفات الجديدة.
  - التنظير Endoscopy و تنظير البطن Laparoscopy : يمكن أن تكون هذه التقنيات مفيدة في تأكيد الإستجابة الكاملة CR عندما يتم أخذ الخزع أو في تحديد النكس، ولكن لا ينصح باستخدامها في القياس.
  - الواسمات الورمية: لا يمكن استخدام الواسمات الورمية لوحدها لتقييم إستجابة الورم المحسوس objective tumor<sup>(٦٣)</sup>.
- حتى الآن يبقى قياس تضاؤل حجم الورم بواسطة التصوير المقطعي المحوسب CT هو الأكثر استخداماً، وعلى أية حال فإن استخدام CT يُعتبر محدود في تحري الإستجابات في الأورام التي لا تتغير في الحجم خلال العلاج، وبالنتيجة فإن العجز في معرفة الإستجابات للمعالجة المطبقة ونتيجة لتطوير الخلايا السرطانية المقاومة بسرعة، فإن الحاجة ملحة للبحث عن تقنيات لمراقبة الاستجابة للمعالجة، والأكثر من ذلك تساعد الإختبارات في تحديد المرضى الغير مستجيبين مبكراً وذلك لإيقاف العلاج الغير فعال وتجنب التعرض غير الضروري للتأثيرات الجانبية.

## الفصل الرابع

# Smac/DIABLO

Smac/DIABLO بروتين استماتة داعم متقدي proapoptotic mitochondrial يتحرر من المتقدرة إلى العصارة الخلوية كاستجابة لمنبهات الاستماتة المتنوعة، متضمنة استخدام أدوية المعالجة الكيميائية كمنبه للاستماتة.

يتأثر Smac/DIABLO مع مثبطات بروتينات الاستماتة في العصارة الخلوية ويثبطها، سامحاً بتفعيل caspases وعملية الاستماتة (٦٤).

وكما ذكرنا في الفصل السابق، يُعد زيادة التعبير عن مثبطات بروتينات الاستماتة من أهم الآليات التي تدفع بالخلية للهروب من الاستماتة وتشكل السرطان لذلك فإن قيام Smac/DIABLO بدوره الطبيعي في الارتبط مع هذه المثبطات سوف يؤدي إلى تحسين الاستماتة ويحمي من نشوء السرطان.

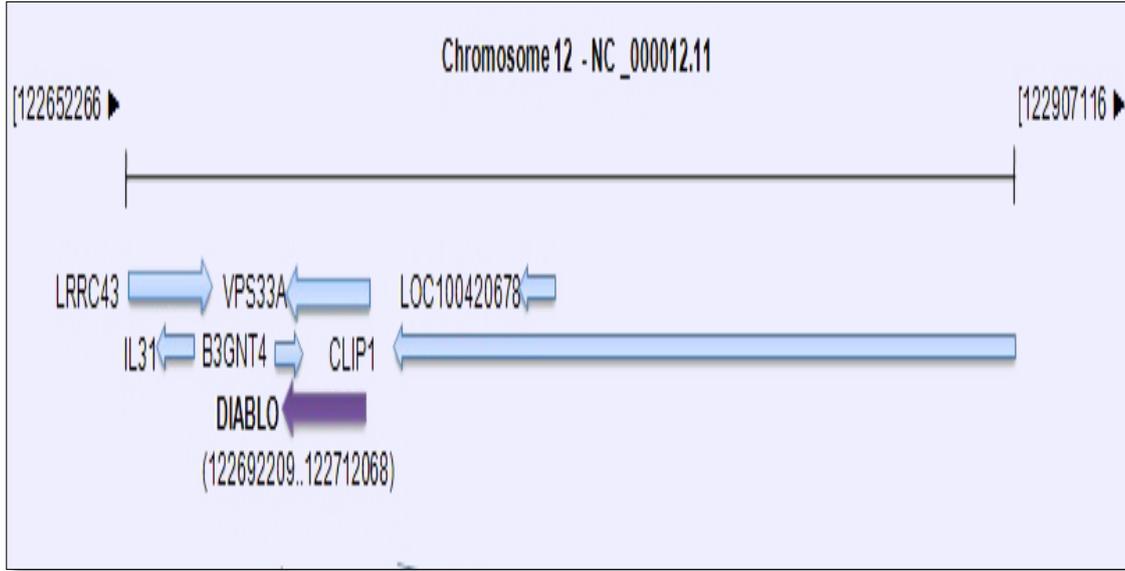
اكتُشف لأول مرة عام 2000 م من قبل العالم Du ورفاقه وأطلقوا عليه اسم Smac ، وهو اختصار لـ Second mitochondria-derived activator of caspase (٦٥)، وفي نفس العام أطلقت عليه مجموعة أخرى من الباحثين اسم Diablo وهو اختصار لـ direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pl isoelectric point (٦٦)

المشتق المتقدي الثاني المفعّل لـ caspases / البروتين الرابط لمثبطات الاستماتة مباشرة.

ومن أسمائه الأخرى: Smac3، Diablo، Smac، DFNA64.

#### ٤-٢ جين Smac/DIABLO

يتوضع الجين عند البشر على الصبغي 12 على الذراع الطويل q في الموقع 24.31 ويبدأ عند 122692209 bp زوج قواعد وينتهي عند 122712068 bp زوج قواعد، ويتألف من 7 إكسونات ويشفر الرنا المرسل لـ 2265 حمض أميني.

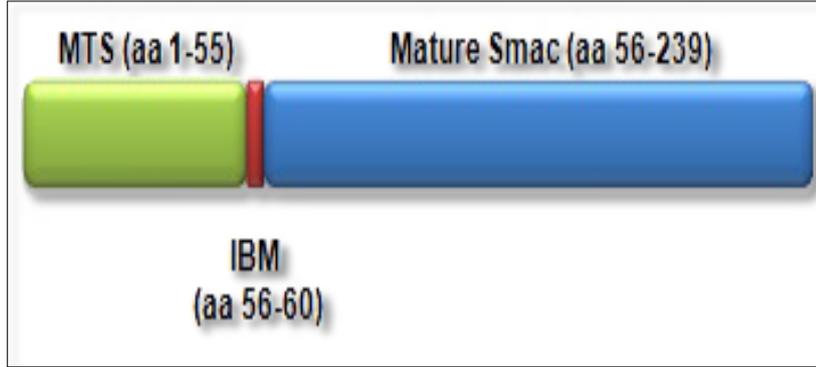


الشكل (١٠): جين Smac/DIABLO وتوضعها على الصبغي 12

#### ٣-٤ البنية Structure

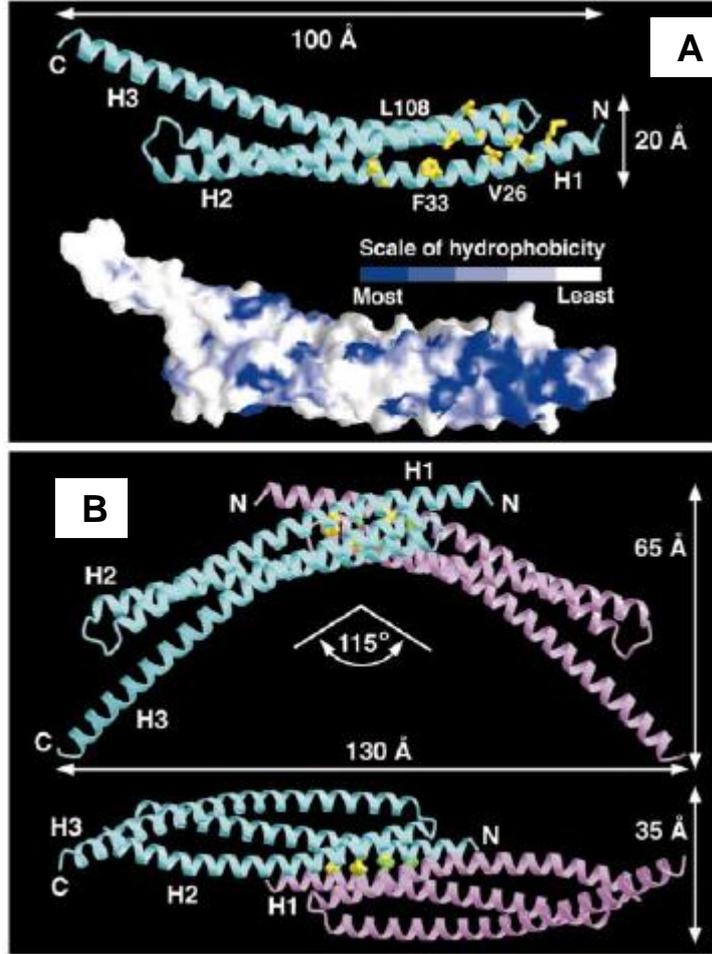
Smac/DIABLO عبارة عن بروتين مؤلف من 239 حمض أميني، ووزنه الجزيئي 27.13 kDa كيلو دالتون. تؤلف أول 55 حمض أميني ما يُعرف بالمتوالية الهدفية المتقدرية MTS mitochondrial targeting sequence، يليها منطقة مؤلفة من أربع حموض أمينية هي الألانين والفالين والبرولين والايذولوسين (56-60) وهي المنطقة الرابطة لمثبطات بروتينات الاستماتة IAP binding motif IBM، ويتألف Smac الناضج من 184 حمض أميني ووزنه الجزيئي 20.7 كيلو دالتون، كما هو موضح في الشكل (٨).<sup>(٦٧)</sup>

يتوضع Smac كطليعة بروتين متقدري في الغشاء الداخلي للمتقدرة، ثم يتفعل بشطر المتوالية الهدفية المتقدرية معطية الشكل الناضج الذي يتحرر إلى الهيولى.



الشكل (١١):<sup>(٦٧)</sup> بنية بروتين Smac

يملك Smac/DIABLO شكلين: موحودي monomeric ومثنوي dimeric ، ويعد الشكل المثنوي هو الشكل الفعال الذي يحفز الاستماتة عندما يتحرر إلى العصارة الخلوية. يتألف الشكل الموحودي من ثلاث حلزونات منحنية bent helix هي H1، H2 و H3 والتي تتوضع داخلها البواقي الكارهة للماء، يجتاز معازان promoters من Smac المثنوي عبر السطح الكاره للماء لحلزونات H1 و H2 بشكل متناظر وتُشكل بنية تشبه شكل القوس arch shape، وتكون النهاية الأمينية في أعلى هذا القوس بينما النهاية الكربوكسيلية في الأسفل وتكون الزاوية بين الساقين  $115^\circ$ . يبلغ طول الشكل المثنوي 130 نانومتر وارتفاعه 65 نانومتر وعرضه 35 نانومتر، وتلعب هذه البنية النهائية دوراً حاسماً في تحفيز بروتينات الاستماتة مثل caspase-3. ويوضح الشكل (٩) رسماً تمثيلاً لبنية Smac حيث نلاحظ في القسم A البنية المتطاولة للشكل الموحودي elongated structure مع البواقي الكارهة للماء hydrophobic residues بينما في القسم B نلاحظ البنية التي تشبه شكل القوس للشكل المثنوي<sup>(٦٨)</sup>.



الشكل (١٢) (٦٨): رسم تمثيلي لبنية Smac/DIABLO

#### ٤-٤ آلية عمل Smac/DIABLO

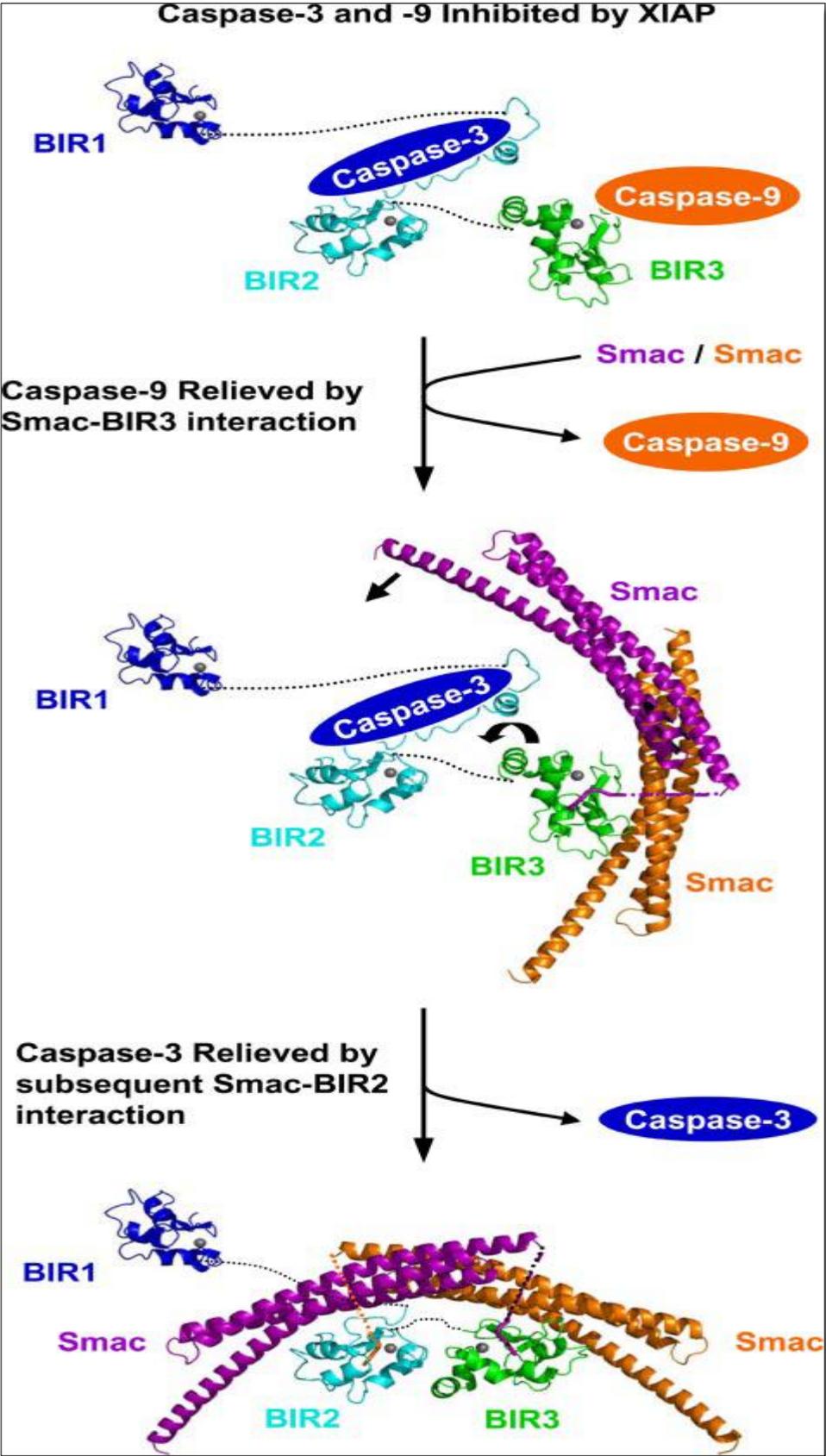
يُشكل تحرر مجموعة من البروتينات الداعمة للاستماتة - ولا سيما Smac/DIABLO - من المتقدرة إلى العصارة الخلوية، المفتاح الأساسي الذي يقود إلى تفعيل caspases وبدء الاستماتة في السبيل الداخلي للموت الخلوي (٦٩). ويتلخص عمله بارتباطه مع مثبطات بروتينات الاستماتة IAPs وتنبيطها وبالتالي تفعيل الاستماتة. إن الارتباط بين Smac/DIABLO و IAPs يتطلب شطر منطقة MTS التي تؤدي إلى ظهور منطقة IBM رباعية الببتيد التي ترتبط بقوة إلى تكرارات BIR الموجودة في IAPs وتشكيل Smac الناضج، حيث تلعب هذه المنطقة ولاسيما حمض الألانين الدور الرئيسي في الارتباط، وهذا ما يفسر أن Smac الناضج فقط هو الشكل الفعال الوظيفي في الخلية (٧٠).

تملك أفراد عائلة IAP ثلاث تكرارات BIR، وكل من BIR1 وBIR2 وBIR3 تكون قادرة على تثبيط caspases بشكل مستقل وكذلك ترتبط مع Smac. وكمثال على ذلك نأخذ (X linked inhibitor of apoptosis protein) XIAP حيث يكون ميدان BIR2 والمنطقة الواصلة بين BIR1 وBIR2 ضروريان لتثبيط كل من caspase-3 و caspase-7، بينما يلعب ميدان BIR3 دوراً هاماً في حجب فعالية caspase-9<sup>(٧١)</sup>. بدايةً، يرتبط Smac/DIABLO مع ميدان BIR3 مستخدماً واحدة فقط من النهايتين الأمينيتين الببتيديتين، وهذا الارتباط لا يعدل فقط من وظيفة XIAP في تثبيط caspase-9، وإنما تحسن من ارتباط النهاية الأمينية الأخرى لـ Smac المثنوي مع ميدان BIR2 وبالتالي إضعاف وظيفة المنطقة الواصلة المجاورة في تثبيط caspase-3. لذلك يتم ارتباط Smac مع ميداني BIR بشكل متعاقب وديناميكي.

يتنافس Smac مع caspase-9 على الارتباط مع BIR3 مما يؤدي إلى تحرير caspase-9 الذي هو الكاسباز البادئ للسبيل الداخلي المتقدي وإتمام تفعيل شلال الاستماتة، بينما لم تعرف آلية تحرير caspase-3 بشكل دقيق لكن يُعتقد أن الارتباط الأول مع BIR3 سوف يشكل إعاقة تجسيمية steric hindrance لارتباط BIR2 مع caspase-3 وتمنع XIAP من تثبيط caspase-3 المستقل، وقد وجدت بعض المجموعات البحثية أن الجزيئات الصغيرة التي تشابه Smac بالمنطقة الببتيدية الرابطة AVPI يمكن أن تعيد بمفردها فعالية caspase-9 دون caspase-3<sup>(٧٢)</sup>.

يرتبط الشكل الموحد مع واحد فقط من BIR، بينما يرتبط المثنوي مع اثنين من BIR بوقت واحد، لذلك يلعب Smac/DIABLO دوراً هاماً في تفعيل حدوث عملية الاستماتة وسيرها بالشكل الصحيح.

ويظهر الشكل (١٠) نموذج عن ارتباط Smac/DIABLO الديناميكي مع مثبطات بروتينات الاستماتة.



الشكل (١٣) (٧٢): آلية عمل Smac/DIABLO

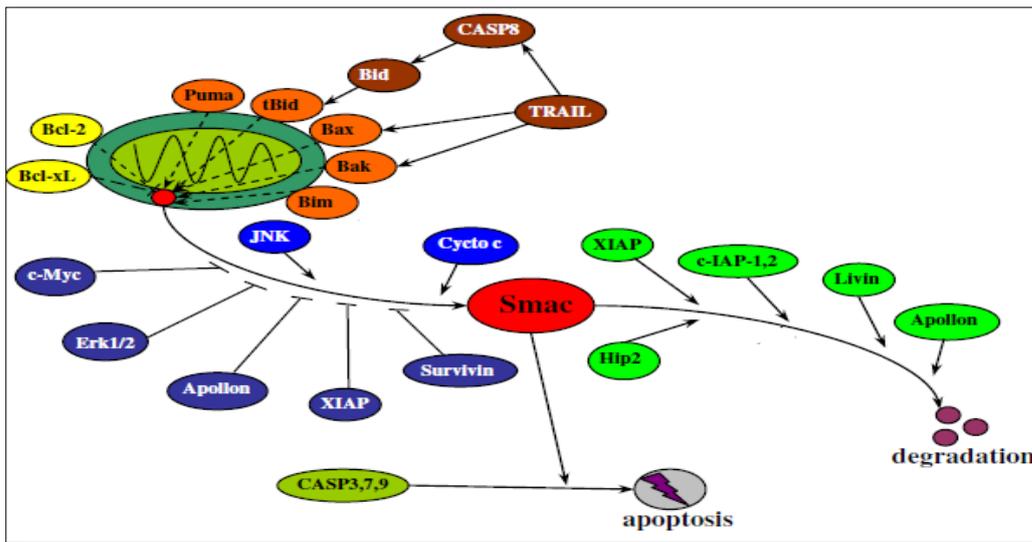
#### ٤-٤-١ الوسائط المؤثرة في عمل Smac/DIABLO

هناك مجموعة من المواد التي تتدخل في نجاح عمل Smac/DIABLO ضمن الخلية وتعزيز تحرره وبالتالي حدوث الاستماتة بشكلها الصحيح، أو تتدخل بتثبيط تحرره أو دفعه للتدرك.

تبتدى بروتينات الغشاء المتقدي Bax و Bak و Bim و tBid و Puma بتحرير Smac/DIABLO من المتقدرة إلى العصارة الخلوية استجابة للإشارة المحرصة للاستماتة، بينما تمنع بروتينات Bcl-2 و Bcl-xL هذا التحرر، ويقوم Smac الهولي بتحريض الاستماتة عبر تفعيل كل من caspase-3 و caspase-7 و caspase-9. يترافق انتقال بروتين JNK (c-Jun N-terminal kinase) من الهولي إلى المتقدرة مع حدوث الاستماتة، وسيؤدي هذا الانتقال إلى زيادة تحرر Smac/DIABLO من المتقدرة<sup>(٧٣)</sup>. وكذلك يساهم cytochrome-c في زيادة تحرر Smac بعد التحريض الاستماتي.

يثبط التعبير الزائد عن c-Myc تحرر Smac وكذلك يمنع بروتين Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) الاستماتة عبر تثبيط عودة انتقال Bax من الهولي إلى المتقدرة وانخفاض تحرر Smac.

أيضاً تلعب مثبطات بروتينات الاستماتة IAPs الدور الأهم في حجب فعالية Smac إما بتثبيط تحرره من المتقدرة أو تدركه، ويوضح الشكل (١١) مجموعة البروتينات التي تتدخل تساهم في زيادة أو تثبيط فعالية Smac.



الشكل (١٤)<sup>(٧١)</sup>: البروتينات المتدخلة في عمل Smac

١-٥-٤ العلاقة بين التعبير عن Smac/DIABLO وتقدم الورم

أظهرت العديد من الدراسات أن Smac/DIABLO يجعل الخلايا الورمية حساسة للإستماتة، وقد شجعت هذه المعطيات على تطوير ببتيدات مشتقة من النهاية الأمينية، وأيضاً جزيئات صغيرة محاكية mimic لوظيفة Smac/DIABLO كعوامل علاجية من أجل تحريض الموت أو زيادة التأثير الإستماتي لعوامل العلاج الكيميائي<sup>(٧٤)</sup>.

ونظراً لأهمية Smac/DIABLO في تحديد حساسية الخلايا السرطانية للموت الاستماتي المحرض بطرق مختلفة، كان من المهم التحري فيما إذا كانت مستويات التعبير عنه يمكن أن تنظم سلبياً خلال بدء أو تقدم الورم، وهذه المعلومة يمكن أن تفيد في جعله واصل انذاري أو علاجي أو في تزويد أهداف جديدة لتصميم الدواء، ومن المتوقع أن الخلايا التي تعبر عنه بشكل منخفض تكون ذات مقاومة عالية للإستماتة ومسؤولة عن تقدم السرطان<sup>(٦٤)</sup>.

وقد ظهر التعبير الجيني والبروتيني عن Smac/DIABLO في مختلف الخلايا السرطانية، ففي سرطان الكبد اختلف التعبير عن Smac/DIABLO بشكل كبير في الأنسجة السليمة مقارنة مع الأنسجة السرطانية، حيث انخفض التعبير عنه في الأنسجة السرطانية<sup>(٧٥)</sup>، وفي سرطان المثانة كان التعبير ينظم سلبياً ويُبنى هذا الانخفاض في مستويات التعبير بإنذار سيء للمرض<sup>(٧٦)</sup>، وكذلك فقد انخفضت المستويات المصلية تقريباً حوالي ضعفين لدى مرضى سرطان المثانة مقارنة مع الأشخاص السليمين، وكان الانخفاض أشد عند المرضى في المراحل الورمية المتقدمة لذلك تُنبئ المستويات المصلية المنخفضة باحتمالية نكس مبكر عند مرضى سرطان المثانة<sup>(٧٧)</sup>، وبالنسبة لسرطان الثدي فقد لوحظ أيضاً انخفاض في التعبير عن Smac/DIABLO عند مريضات سرطان الثدي، كما لوحظ ارتباط عكسي بين هذا التعبير ومرحلة تطور الورم<sup>(٧٨)</sup>، وبالإضافة إلى ذلك فقد انخفض التعبير الجيني عن RNA المرسل لـ Smac/DIABLO في العينات السرطانية كما لوحظ ارتباط عكسي مع التعبير الجيني عن Survivin الذي هو من مثبطات بروتينات الإستماتة<sup>(٧٩)</sup>، وفي سرطان البطني الرحمي ارتبط التعبير البروتيني عن Smac/DIABLO مع مرحلة الورم، ويعد التعبير السلبي عنه إشارة لإنذار سيء في مثل هذا النوع من السرطانات<sup>(٨٠)</sup>، ويُنظم التعبير البروتيني بشكل سلبي في سرطان المبيض وهو يرتبط بشكل عكسي أيضاً مع التعبير عن Survivin<sup>(٨١)</sup>، وبالنسبة لسرطان

الرئة فقد كان التعبير الجيني أقل في الخلايا السرطانية منه في الأنسجة السليمة، وقد انخفض في سرطان الخلايا الحرشفية squamous بشكل أكبر من السرطانة الغدية adenocarcinomas وكذلك انخفض التعبير عند مرضى سرطان الرئة المدخنين بشكل أكبر من المرضى غير المدخنين، وقد ارتبط هذا التعبير بشكل عكسي مع مرحلة تطور الورم وأيضاً يعد التعبير المنخفض إشارة لإنذار سيء للمرض<sup>(٨٢)</sup>، ومقارنة مع Survivin فقد تبين أن مرضى سرطان الرئة الذين يبدون تعبير مرتفع عن Survivin سيكون لديهم احتمالية أقل في البقاء على قيد الحياة مقارنة مع المرضى الذين لديهم تعبير منخفض، وعلى النقيض يُظهر المرضى الذين لديهم تعبير منخفض عن Smac/DIABLO احتمالية أقل في البقاء على قيد الحياة مما جعلهما مفيدان في التنبؤ عن البقاء لدى المرضى المعالجين بالمعالجات الكيميائية وإمكانية التزويد بمعلومات جديدة للوصول إلى استراتيجيات علاجية أفضل<sup>(٨٣)</sup>، وفي سرطان الكولون المستقيمي كان المرضى سلبياً Smac/DIABLO أكثر عرضة لحدوث النقائل وانتقال الورم للعقد اللمفية المجاورة من المرضى ايجابياً Smac/DIABLO، لذلك يُنبئ التعبير السلبى باحتمالية ضعيفة لبقاء المريض على قيد الحياة<sup>(٨٤)</sup>، وفي سرطان الخصية يُنظم التعبير سلبياً خلال تطور وتقدم الورم<sup>(٨٥)</sup>، وكذلك الأمر عند مرضى سرطان الكلية حيث انخفض التعبير البروتيني مقارنة مع الأصحاء ويُنبئ هذا الانخفاض بإنذار سيء للمرض<sup>(٨٦)</sup>.

وكما سبق، وجدت معظم الدراسات أن هناك ارتباط عكسي بين مستويات التعبير الجيني أو البروتيني عن Smac/DIABLO وبين مرحلة تطور وتقدم الورم، فكلما كان الورم أكثر تطوراً وفي مراحله المتقدمة كلما كان التعبير منخفض بشكل أكبر، كما يُعد فقدان التعبير عن Smac/DIABLO في الخلايا السرطانية دليل إنذاري سيء للمرض ونكس المريض، ويتم استخدام طرق الكيمياء النسيجية المناعية IHC بمختلف تقاناتها لتحديد التعبير عنه في المقاطع والخزعات النسيجية وهي الطرق التي كانت سائدة في مختلف الدراسات منذ اكتشاف هذا البروتين مقارنة مع طرق التحري عنه في الدم.

#### ٤-٥-٢ استخدامات Smac/DIABLO العلاجية

تم تطوير عدة معالجات سرطانية معتمدة على Smac/DIABLO خلال العشر سنوات الماضية، حيث ركزت هذه الاستراتيجيات العلاجية بشكل عام على تطوير المعالجة من

خلال طريقتين: إما زيادة التعبير الجيني عن Smac/DIABLO أو تطوير مركبات جديدة تشبه Smac/DIABLO وسميت محاكيات Smac/DIABLO mimetics. تستطيع زيادة التعبير عن Smac/DIABLO أن تحرض الاستماتة في الخلايا السرطانية وأن تُحسس هذه الخلايا للمعالجة الكيميائية والمعالجة الإشعاعية<sup>(٤٧)</sup>، حيث وجد Fandy وزملائه أن ازدياد التعبير الجيني سيحسن الاستماتة المحرصة بالأدوية الكيميائية مثل doxorubicin و paclitaxel وكذلك المحرصة بالإشعاع في خلايا سرطان الثدي، مما يؤدي إلى زيادة الارتباط بين Smac/DIABLO و IAPs والتي تؤدي نهاية إلى زيادة فعالية caspase-3 و حدوث الاستماتة، وبالإضافة إلى ذلك يقوم Smac/DIABLO بزيادة حساسية الخلايا المقاومة على TRAIL للمعالجة في الخطوط الخلوية لسرطان الثدي ودفعها للاستماتة، مما جعل منه مرشح واعد جديد في علاج السرطان من خلال دوره في زيادة فعالية العلاجات السامة للخلايا السرطانية<sup>(٨٧)</sup>.

#### ٤-٥-٢-١ محاكيات Smac/DIABLO mimetics

تُعد المقاومة التي تبديها مختلف الأنواع السرطانية على استراتيجيات المعالجة الكيميائية أو الإشعاعية أو المناعية تحدي كبير في مجال علم الأورام، لذلك كان من الضروري التوجه إلى ابتكارات جديدة مضادة للسرطان لزيادة الاستجابة العلاجية وتقليل الآثار الجانبية الجهازية المرافقة للعلاجات القليلة الفعالية.

وعلى اعتبار أن معظم المعالجات المضادة للسرطان تعتمد في استجابتها وفعاليتها على تحسين الآلية الطبيعية للموت الخلوي المبرمج في الخلية، فقد أصبحت سبل الاستماتة بشكل سريع أهداف لابتكارات المعالجة الكيميائية من خلال تحسين عملية الاستماتة كنتيجة للشدة الخلوية في الأنسجة السريعة الانقسام. مما دفع إلى تطوير جزيئات جديدة هي محاكيات Smac/DIABLO وهي جزيئات تشبه في عملها عمل Smac/DIABLO وعُرفت لأول مرة عام 2004 من قبل العالم Li ورفاقه<sup>(٨٨)</sup>.

إن تحديد البنية الكيميائية الحيوية النوعية للمنطقة المسؤولة عن الارتباط بين Smac و IAPs قد سهلت تطوير جزيئات تشبه Smac، حيث تملك النهاية الأمينية لـ Smac أربع بواقي أمينية هي الألانين والفالين والبرولين والإيزولوسين والتي ترتبط مع ميدان BIR3 لبروتين XIAP، وحالما توضحت هذه البيئة كان من السهل تطوير محاكيات Smac والتي زودت بمجموعة متنوعة من الجزيئات التي يمكن أن تعمل كمضادات

لمثبطات بروتينات الاستماتة حيث تتألف عادة من آخر أربعة إلى ثمانية حموض أمينية (٨٩).

ولا يقتصر عملها فقط على الارتباط مع مثبطات بروتينات الاستماتة وإنما يمكن لها أن تحرض الاستماتة بطرق أخرى مثل زيادة فعالية عامل النخر الورمي ألفا TNF $\alpha$  الذي يفعل سبيل الاستماتة الخارجي المرتبط بمستقبلات الموت مؤدياً إلى تفعيل caspases. ولا يزال استخدام هذه المركبات يُعتبر تجريبياً وقيدها الدراسة، وقد دعمت عدة أدلة الفائدة الحالية لأنماط المحاكيات المتنوعة كالبيبتيدات أو النوكليوتيدات المتعددة أو المركبات في احتمالية استخدامها كعوامل مضادة للسرطان في خباثات مختلفة. ومن محاسن استخدام هذه المحاكيات أنها يمكن أن تساعد في التغلب على المقاومة للمعالجات السرطانية التقليدية وأنها يمكن أن تحرض موت الخلية بمفردها أو بالمشاركة مع المعالجات الأخرى، حيث تُزيد المعالجة المشتركة بين محاكيات Smac و paclitaxel من حدوث الاستماتة في خلايا سرطان الثدي أكثر من استخدام paclitaxel بمفرده (٩٠).

وكمثال على ذلك نذكر الخلايا السرطانية الكلوية Caki-1 والتي تملك مستويات مرتفعة من البروتين المثبط للاستماتة XIAP، حيث ستتغلب معالجة هذه الخلايا بالبيبتيد المحاكي Smac-N7 (AVPIAQK) على زيادة التعبير عن XIAP وتجعلها أكثر حساسية للاستماتة المحرزة بالعلاج الكيميائي cisplatin<sup>(٩١)</sup>، كذلك تقوم هذه البيبتيدات بزيادة الاستماتة المحرزة بـ TRAIL عبر السبيل الخارجي في خلايا الخط الخلوي AsPC-1 لسرطان البنكرياس<sup>(٩٢)</sup>، ويقوم المحاكي المؤلف من ثماني حموض أمينية Smac-N8 بتحريض الاستماتة في خلايا H460 لسرطان الرئة المقاومة للمعالجة بـ cisplatin<sup>(٩٣)</sup>.

# الدراسة العملية

## ١- هدف الدراسة Aim of Study

يُعد السرطان من أهم الأمراض المسببة للوفاة في جميع أنحاء العالم، ونظراً للكلفة الاقتصادية الكبيرة التي تتحملها الجهات المعنية في معالجة مرضى السرطان بالإضافة إلى احتمالية تطبيق نظام علاجي خاطئ عند بعض المرضى، فقد دفعت بنا هذه الوقائع إلى البحث عن واصمات جديدة تفيد في تشخيص مرض السرطان ومراقبة فعالية المعالجة المطبقة على مرضى السرطان.

لذلك ركزت هذه الدراسة على كشف التغير في تراكيز Smac/DIABLO لدى مرضى السرطان، وذلك قبل البدء بالمعالجة وبعد أسبوع من الجرعة الأولى وبعد أسبوع من الجرعة الثالثة للمعالجة المطبقة، حيث تُعد هذه الدراسات جديدة وحديثة في منشورات الأدب الطبي وبالمقارنة مع البروتينات الأخرى التي تتدخل في الإستماتة، فإنه قد تم إنجاز فقط عمل قليل في مجال دراسة التعبير عن Smac/DIABLO في سرطان المثانة والبروستاتة، لذلك هدفت الدراسة إلى:

♥ تقييم دور Smac/DIABLO في تشخيص السرطان وذلك من خلال قياس تركيز Smac/DIABLO المصلي لدى مرضى سرطان المثانة ومرضى سرطان البروستاتة ومجموعة الأصحاء ( المجموعة الشاهدة)، وإمكانية اعتباره مثبتة تشخيصية إنذارية للمرض.

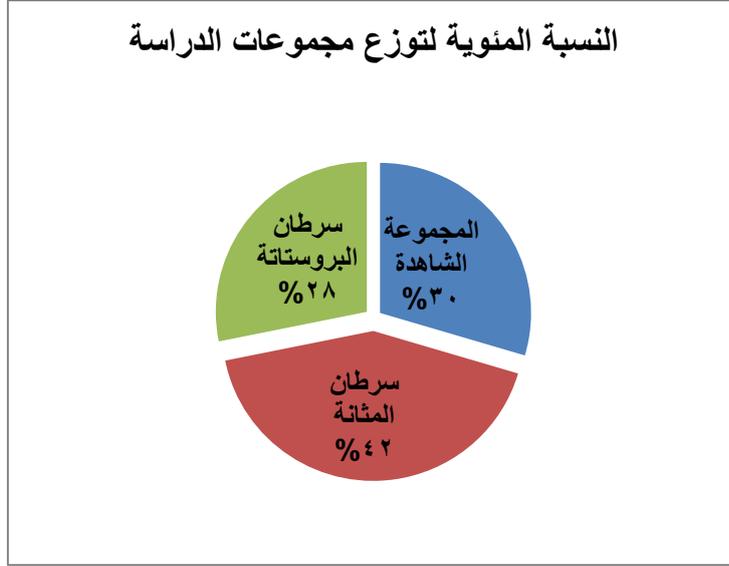
♥ تقييم دور Smac/DIABLO في التنبؤ بالاستجابة السريرية المحتملة للمعالجة المطبقة عند المرضى وذلك من خلال دراسة العلاقة ما بين مقدار الإرتفاع Fold increase في تركيز Smac/DIABLO المصلي والاستجابة السريرية الناتجة بعد الجرعة الثالثة والمقدمة من قبل الطبيب.

## ٢- المواد والطرق Materials and methods

### ١-٢ مجموعات الدراسة Study groups:

شملت الدراسة ٧١ شخص تراوحت أعمارهم ما بين ٣٥ - ٧٥ عاماً، جمعت العينات في الفترة الواقعة بين تموز ٢٠١٣ و آب ٢٠١٤ من مشفى الهلال الأحمر السوري وقسمت المجموعات وفق مايلي:

- المجموعة الشاهدة: وهي مجموعة الأصحاء التي تضم ٢١ شخص لا يعانون من أي أعراض بولية وليس لديهم قصة عائلية للمرض.
- مجموعة مرضى سرطان المثانة: تضم ٣٠ مريض/ة سرطان مثانة وأيضاً مقسمة إلى ثلاث مجموعات وفقاً لنتيجة التشريح المرضي وحسب نموذج TNM لهؤلاء المرضى حيث قسمت كما يلي:
  - شملت المجموعة الأولى ١٤ مريض (١٢ مريض ذكر ومريضتين) مُشخص لديهم سرطان مثانة في المرحلة الأولى T1 حسب نتيجة التشريح المرضي، غير متلقين لأي نمط علاجي سابق ومن تم إخضاعهم للنظام العلاجي الكيميائي Doxorubicin 50 mg كحقن موضعي ضمن المثانة وتكرر هذه الجرعة كل أسبوع.
  - شملت المجموعة الثانية ٨ مرضى ذكور مُشخص لديهم سرطان مثانة في المرحلة الثانية T2 غير متلقين لأي نمط علاجي سابق ومن تم إخضاعهم للنظام العلاجي الكيميائي paclitaxel 300 mg, cisplatin 70 mg كتسريب وريدي وتكرر هذه الجرعة كل ٢١ يوم لدى هؤلاء المرضى.
  - شملت المجموعة الثالثة ٨ مرضى ذكور مُشخص لديهم سرطان مثانة في المرحلة الثالثة T3 كذلك غير متلقين لأي نمط علاجي سابق ومن تم إخضاعهم للنظام العلاجي الكيميائي التالي: paclitaxel 300 mg, cisplatin 70 mg كتسريب وريدي حيث تكرر هذه الجرعة كل ٢١ يوم لدى هؤلاء المرضى.
- مجموعة مرضى سرطان البروستاتة: تضم ٢٠ مريض مُشخص لديهم سرطان البروستاتة وفقاً لنتيجة التشريح المرضي وقيم PSA لديهم، غير متلقين لأي علاج سابق ومن تم إخضاعهم للعلاج الهرموني Casodex 100 mg حبة يومياً.



الشكل (١٥): توزيع مجموعات الدراسة

#### معايير الإدخال والاستبعاد:

تراوحت أعمار المرضى بين ٣٥ و ٧٥ سنة مشخصين بشكل مؤكد استناداً لنتيجة التشريح المرضي وغير معالجين بأي نمط علاجي سابق، وتم استبعاد من كان متلقي سابق للمعالجة الهرمونية أو الكيميائية أو الدوائية قبل أخذ عينات المرحلة الأولى.

#### ٢-٢ الاعتيان Sampling:

تم جمع ٥ مل من الدم ببزل الوريد لكل من المرضى والأصحاء على أنبوب جاف، ثم فصل المصل بالثقليل بسرعة 1000xg لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في المنبذة، ثم وزع المصل في أنابيب ابيندروف وتم حفظ الأنابيب في المجمدة الموجودة في كلية الصيدلة- جامعة دمشق بدرجة حرارة - ٨٠ درجة مئوية حتى وقت المقايسة، وبناء على نتائج التشريح المرضي جرى تقسيم العينات المحفوظة وفقاً لمجموعات الدراسة.

#### ١-٢-٢ مراحل العمل:

جمعت العينات في الفترة الواقعة بين تموز ٢٠١٣ و آب ٢٠١٤ وذلك على ثلاث مراحل:

● المرحلة الأولى: امتدت ما بين ٢٠١٣ /٧ إلى ٢٠١٣ /١٠ حيث جمعت العينة الأولى من مرضى سرطان المثانة والبروستاتة قبل البدء بأي نمط علاجي، وجمعت العينة الثانية بعد أسبوع من تلقيهم للجرعة الأولى.

● المرحلة الثانية: امتدت ما بين ٢٠١٣ /١٢ إلى ٢٠١٤ /٤ حيث كانت هذه المرحلة متداخلة مع سابقتها وتم فيها متابعة المرضى المعالجين ومن ثم جمع العينة الثالثة بعد أسبوع من تلقيهم للجرعة الثالثة.

● المرحلة الثالثة: امتدت ما بين ٢٠١٤ /٥ إلى ٢٠١٤ /٨ وهي أيضا متداخلة مع سابقتها وتم فيها متابعة للمرضى والتحري عن مدى استجابتهم للعلاج المطبق بالإضافة إلى جمع عينات جديدة من مرضى جدد بعد أسبوع من جرعاتهم الأولى والثالثة.

يبدأ الطبيب بتقييم استجابة المريض للمعالجة ابتداءً من الفترة التي تلي تلقي المريض للجرعة الثالثة لذلك تم سحب العينات بعد أسبوع من الجرعة الثالثة، ولكن نظراً للتطبيقات العلاجية الخاطئة الكثيرة المشاهدة في مشافينا فقد حاولنا ايجاد طريقة للتحري المبكر عن الاستجابة بعد الجرعة الأولى.

وقد سجلت بيانات المرضى في بطاقات استبيان موضحة كما يلي:

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

تعيين قيم **Smac/DIABLO** المصلية لدى مرضى سرطان سوريين معالجين

بحث علمي أعد لنيل درجة الماجستير في الأحياء الدقيقة

اعداد الصيدلانية رشا عرموطي

إشراف أ.م.د جمانة الصالح

رقم المريض ..... اسم المريض ..... العمر .....

رقم الاضبارة .....

عنوان المريض ..... رقم الهاتف .....

التشخيص ..... مرحلة الورم .....

القصة العائلية .....

المرحلة الأولى: تاريخ أخذ العينة .....

تركيز **Smac/DIABLO** بيكو غرام قبل العلاج .....

تركيز **PSA** نانوغرام .....

المرحلة الثانية: تاريخ أخذ العينة .....

نوع المعالجة المطبقة .....

تركيز **Smac/DIABLO** بيكو غرام بعد اول جرعة .....

تركيز **PSA** نانوغرام .....

المرحلة الثالثة: تاريخ أخذ العينة .....

نوع المعالجة المطبقة .....

تركيز **Smac/DIABLO** بيكو غرام بعد ثالث جرعة .....

تركيز **PSA** نانوغرام .....

تقييم الاستجابة النهائية من الطبيب المعالج .....

## ٣-٢ الموافقة المستنيرة:

استمارة الموافقة على المشاركة في البحث

**عنوان الدراسة :** تعيين قيم Smac/DIABLO المصلية لدى مرضى سرطان سوريين معالجين.

**الباحث :** الصيدلانية رشا عرموطي.

**هدف البحث :** تعيين قيم Smac/DIABLO في مصل دم مرضى سرطان مئانة وبروستاتة قبل وبعد إنهاء المعالجة المطبقة للبحث عن إمكانية إيجاد علاقة بين الإستجابة ومقاومة المعالجة ومقدار التغير في الترايز.

**المخاطر أو الآثار الجانبية :** من الممكن أن يحدث ازرقاق بسيط في اليد نتيجة سحب الدم يزول بعد فترة أقصاها يومين .

**فوائد البحث :** نظراً للكلفة المرتفعة لعلاج السرطان على الدولة والمريض والمجتمع ككل، دعت الحاجة إلى إيجاد طريقة سهلة وسريعة لتقييم مدى فعالية المعالجة للوصول إلى النظام العلاجي الأمثل للمريض مما يخفف العبء الإقتصادي ويحول دون تعرض المرضى الغير مستجيبين للتأثيرات الدوائية غير المرغوبة للعلاج المطبق واستبداله بنظام علاجي آخر في مرحلة مبكرة.

**المشاركة طوعية:** إن مشاركتك في هذا البحث هي مشاركة طوعية بالكامل وتستطيع أن تختار التوقف عنها في أي وقت ولأي سبب.

**إن توفقت عن المشاركة بالبحث أو رفضك للإجابة عن أية أسئلة خاصة لن تؤثر على علاقتك بالباحث أو أية جهة مرتبطة بالبحث.**

**أسئلة عن البحث؟** إذا كان لديك أي استفسار أو سؤال عن البحث بشكل عام، أو عن دورك في البحث بشكل خاص، فلا تتردد في طرحه على الباحث بشكل مباشر أو لاحقاً من خلال الاتصال على الرقم (٠٩٣٢٣٦٢٣٣٢) أو التواصل من خلال الايميل ([rashaarmoutly@hotmail.com](mailto:rashaarmoutly@hotmail.com))

**الحقوق القانونية و التوقيع :**

أنا.....موافق/ة على المشاركة في بحث (تعيين قيم Smac/DIABLO المصلية لدى مرضى سرطان سوريين معالجين) المنجز من قبل (الطالبة رشا عرموطي).

لقد فهمت طبيعة البحث و أود المشاركة و توقيعي المدرج في الأسفل هو دليل موافقتي.

إن موافقتك على الإشتراك بهذه الدراسة تتطلب منك الإلتزام بمايلي:

الإجابة على عدد من الأسئلة و سحب الدم لمرة واحدة أو أكثر.

توقيع الباحث .....

اسم المشارك وتوقيعه .....

تاريخ المشاركة .....

عنوان الإقامة بالتفصيل ورقم الهاتف.....

## ٤-٢ الطرق المستخدمة Used methods:

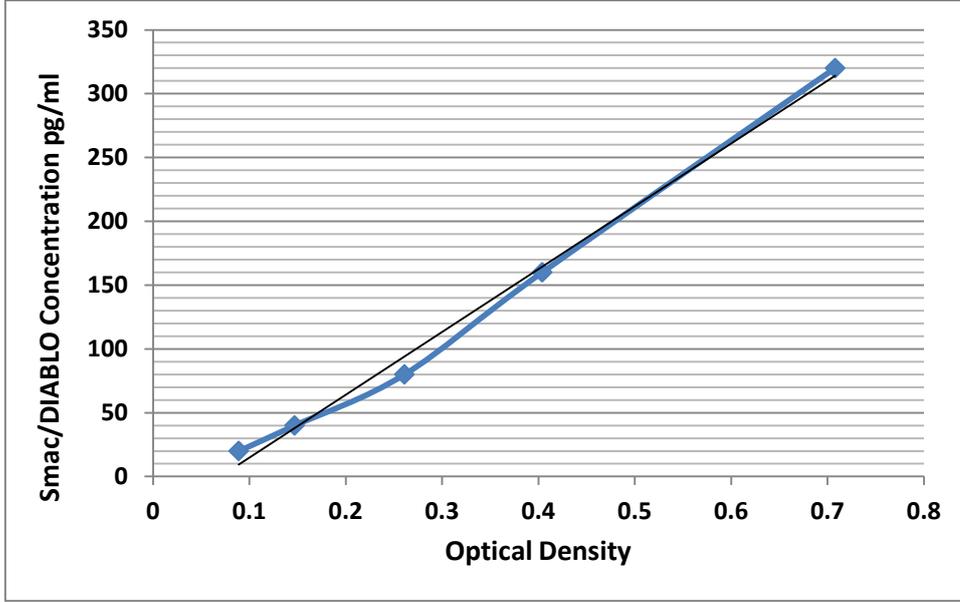
### ١-٤-٢ طريقة المقايسة:

جرت مقايسة Smac/DIABLO بطريقة الامتزاز المناعي المرتبط بالإنزيم-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) باستخدام عتيدة ELISA Kit المصنعة من قبل شركة SunRed الصينية في مخبر المصليات التابع لمركز بنك الدم.

### ٢-٤-٢ مبدأ المقايسة:

يعتمد مبدأ كشف Smac/DIABLO باستخدام طاقم شركة SunRed على طريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم نمط الشطيرة المضاعفة (double-antibody sandwich enzyme – linked ELISA)، حيث يضاف المصل في المرحلة الأولى إلى أبار طبق المعايرة الحاوية أضعاد وحيدة النسيلة ضد Smac/DIABLO فيرتبط الجزء المراد مقايسته بأضعاده، ثم تتم إضافة أضعاد الجزيء المراد مقايسته المقترنة بالبيوتين biotin-conjugated antibody، و ثم محلول بيروكسيداز فجل الخيل المقترن بالستربتافيدين فيتشكل معقد مناعي، نقوم بعملية الحضان بدرجة حرارة 37 م<sup>0</sup> لمدة ساعة، ثم نقوم بعملية الغسيل، ثم يتم إضافة الركازة الملونة ونحضان بدرجة حرارة 37 م<sup>0</sup> لمدة 10 دقائق في الظلام، يؤدي ذلك إلى ظهور لون أصفر وذلك بعد أن يتم إيقاف التفاعل بإضافة محلول التوقف ويُقاس اللون الناتج باستخدام ELISA-reader (قارئ إليزا) بطول موجة 450 نانومتر.

تم حساب قيمة تراكيز Smac/DIABLO في العينات المدروسة من خلال رسم المنحنى الذي يمثل العلاقة بين الكثافة الضوئية المقاسة في الدراسة وتراكيز المحاليل العيارية لـ Smac/DIABLO، كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل (١٦): منحنى العلاقة بين الكثافة الضوئية المقاسة في الدراسة وتراكيز المحاليل العيانية لـ Smac/DIABLO

## ٥-٢ التحليل الإحصائي Statistical analysis:

- تم التعبير عن القيم المختلفة بحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لكل المجموعات.
- تم استخدام اختبار T- student لتحديد كون الفارق بين المتوسطات ناجماً عن المصادفة أم أنه هناك فارق جوهري ذو دلالة احصائية.
- تم استخدام اختبار Chi-square لدراسة العلاقة ما بين أنماط الإستجابة السريرية المقدمة من قبل الطبيب و التغيرات في تراكيز Smac/DIABLO بعد الجرعة الأولى والثالثة.
- تم استخدام اختبار ANOVA للمقارنة بين المتوسطات لأكثر من مجموعتين.
- تم استخدام اختبار Pearson لدراسة علاقات الارتباط بين المتغيرات العددية.
- تم استخدام اختبار Spearman rho لدراسة علاقات الارتباط بين المتغيرات غير العددية.

- اعتمدت قيمة  $P < 0.05$  كقيمة يعتد بها إحصائياً.

جرت الدراسة الإحصائية اعتماداً على برنامجي SPSS و Microsoft Excel 2007.

### ٣- النتائج Results:

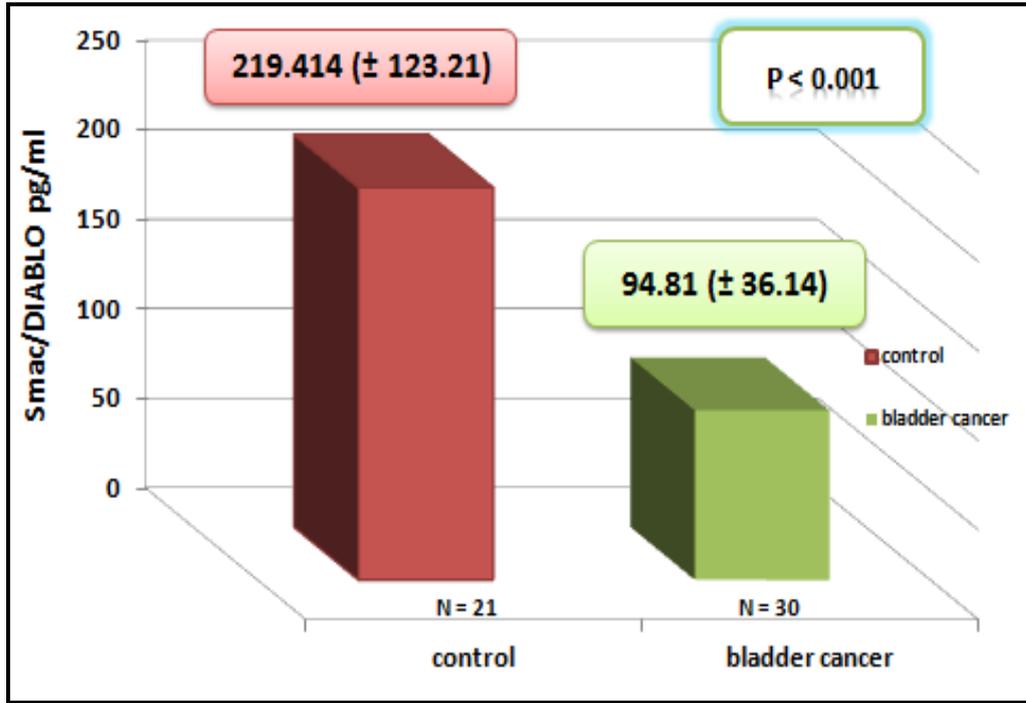
#### ٣-١ نتائج دراسة Smac/DIABLO عند مرضى سرطان المثانة:

٣-١-١ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي عند مجموعة المرضى وعند المجموعة الشاهدة:

تمّ قياس تركيز Smac/DIABLO عند المجموعة الشاهدة المؤلفة من 21 شخص، ومقارنته مع تركيز Smac/DIABLO البدئي قبل بدء المعالجة الكيميائية عند مجموعة مرضى سرطان المثانة المكونة من 30 مريض/ة، حيث بلغت قيمة المتوسط الحسابي لتركيز Smac/DIABLO  $\pm$  الانحراف المعياري لدى المجموعة الشاهدة  $219.414(\pm 123.21)$  بيكوغرام/مل، بينما بلغت قيمة المتوسط الحسابي لتركيز Smac/DIABLO البدئي  $\pm$  الانحراف المعياري  $94.81(\pm 36.14)$  بيكوغرام/مل لدى مجموعة المرضى.

وللمقارنة ما بين متوسط تركيز Smac/DIABLO عند المجموعة الشاهدة والتركيز البدئي عند مجموعة المرضى، تم استخدام اختبار T- student وكانت قيمة  $P \text{ value} = 0.0001$  أي يوجد فارق جوهري يُعتد به إحصائياً بين تركيز Smac/DIABLO البدئي عند المرضى وتركيزه عند المجموعة الشاهدة.

ويوضح الشكل (١٧) تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان المثانة.



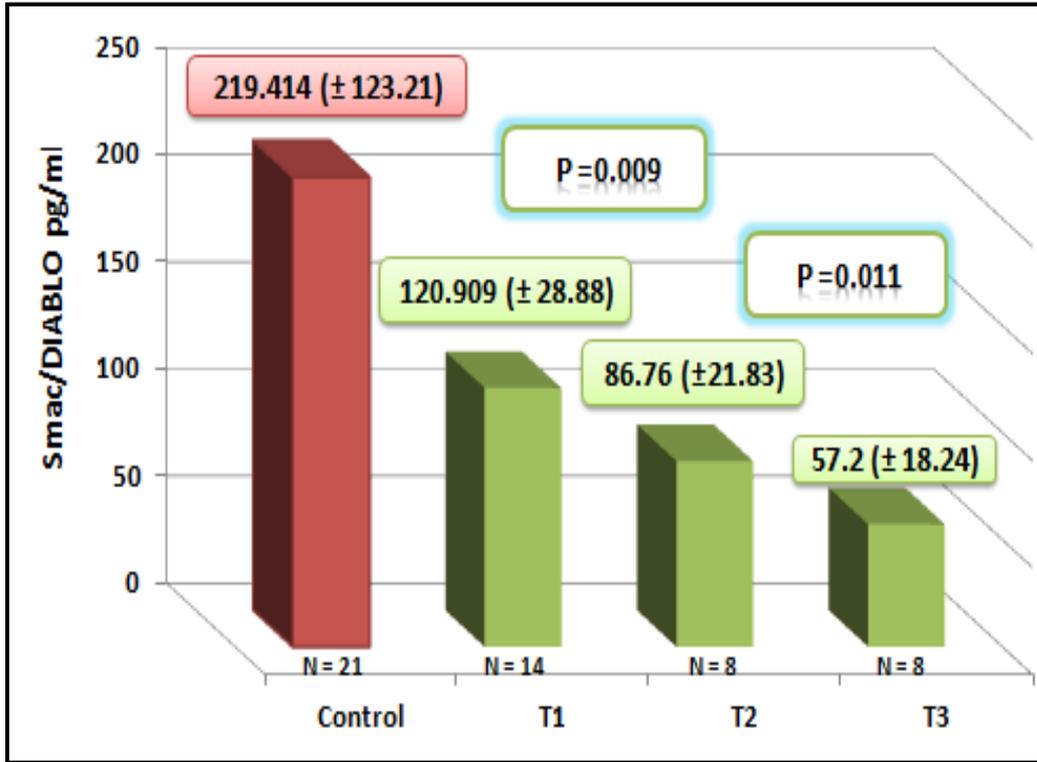
الشكل (١٧): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان المثانة

### ٣-١-٢ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى المجموعة الشاهدة ومجموعات مرضى سرطان المثانة:

تم قياس تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى المجموعة الشاهدة ولدى المجموعات الثلاث لمرضى سرطان المثانة والمقسمة وفقاً لنتيجة التشريح المرضي ومن ثم حساب المتوسط الحسابي لكل مجموعة، فكان متوسط تركيز Smac/DIABLO للمجموعة الشاهدة  $\pm$  الانحراف المعياري  $219.414(\pm 123.21)$  بيكوغرام/مل، وبلغت قيمة المتوسط الحسابي لتراكيز Smac/DIABLO البدئي  $\pm$  الانحراف المعياري  $120.909 (\pm 28.88)$  بيكوغرام/مل لدى مجموعة مرضى سرطان المثانة من المرحلة الأولى T1، وبلغت قيمة المتوسط الحسابي لتراكيز Smac/DIABLO البدئي  $\pm$  الانحراف المعياري  $86.76 (\pm 21.83)$  بيكوغرام/مل لدى مجموعة مرضى سرطان المثانة من المرحلة الثانية T2، وبلغت قيمة المتوسط الحسابي لتراكيز Smac/DIABLO البدئي  $\pm$  الانحراف المعياري  $57.2 (\pm 18.24)$  بيكوغرام/مل لدى مجموعة مرضى سرطان المثانة من المرحلة الثالثة T3.

وللمقارنة ما بين متوسط تراكيز Smac/DIABLO لدى المجموعة الشاهدة والتركيز البدئي لدى المجموعات الثلاث للمرضى، تم استخدام اختبار one way ANOVA وكانت قيمة  $P \text{ value} = 0.009$  بين مجموعة مرضى T1 ومجموعة مرضى T2 أي أن هناك فرق جوهري يعتد به احصائياً بين المجموعتين، وكانت قيمة  $P \text{ value} = 0.011$  بين مجموعة مرضى T2 ومجموعة مرضى T3 أي أن هناك فرق جوهري يعتد به احصائياً بين المجموعتين.

ويوضح الشكل (١٨) تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعات مرضى سرطان المثانة.

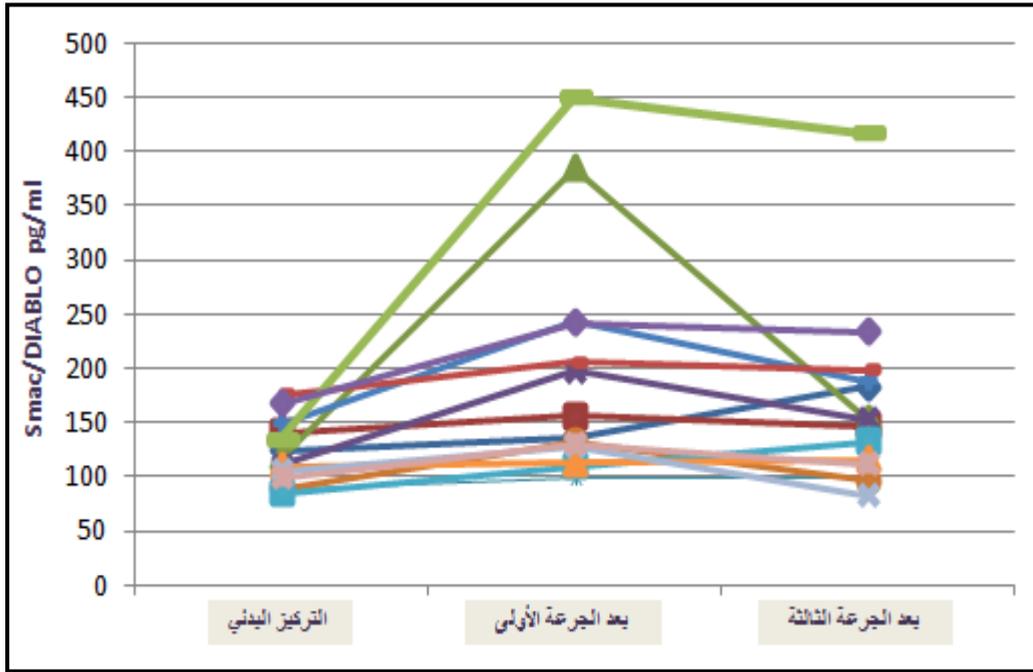


الشكل (١٨): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعات مرضى سرطان المثانة.

٣-١-٣ نتائج دراسة علاقة الارتباط بين مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO المصلي والاستجابة السريرية:

ركزت دراستنا على قياس مقدار الارتفاع (Fold increase) الحاصل في تركيز Smac/DIABLO انطلاقاً من التركيز البدئي، حيث عمدنا إلى حساب كم ضعف ارتفع التركيز سواء بعد أسبوع من الجرعة الأولى أو بعد أسبوع من الجرعة الثالثة ونسبه إلى التركيز البدئي الذي تمّ قياسه عند كل مريض.

قمنا بدايةً بقياس تركيز Smac/DIABLO (بيكوغرام/مل) لكل مريض/ة في كل مرحلة، ثمّ عمدنا إلى حساب مقدار الإرتفاع Fold increase الحاصل عند كل من : بعد أسبوع من الجرعة الأولى، و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة وقد أظهرت نتائج مقايسة Smac/DIABLO التي تمت على ثلاث مراحل لكل مريض النتائج المبينة في الشكل التالي:



الشكل (١٩): تراكيز Smac/DIABLO المختلفة عند كل مريض و مريضة خلال مراحل المعالجة (قبل البدء بالمعالجة الكيميائية، وبعد أسبوع من الجرعة الأولى و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة)

وبلغت قيمة المتوسط الحسابي لتراكيز Smac/DIABO بعد أسبوع من الجرعة الأولى 197.9 بيكوغرام/مل، بينما كانت القيمة 171.33 بيكوغرام/مل بعد أسبوع من الجرعة الثالثة لدى مجموعة مرضى سرطان المثانة (٣٠ مريض)، وبتطبيق اختبار ANOVA وجدنا فارق جوهري يعتد به احصائياً بين التركيز البدئي للمرضى وبين التراكيز بعد الجرعتين حيث كانت قيمة  $P \text{ value} < 0.05$ .

وعند قيامنا بفرز للإستجابات المختلفة التي أظهرها المرضى بعد خضوعهم للمعالجة الكيميائية (المقدمة من قبل الطبيب وفقاً للفحص السريري والصور الشعاعية) مع مقدار الإرتفاعات في تركيز Smac/DIABLO الناتجة بعد أسبوع من أخذ الجرعة الأولى تبين لدينا النتائج كما في الجدول التالي:

الجدول (٣): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى مع الاستجابة السريرية لدى مرضى سرطان المثانة

الاستجابة السريرية		مقدار الارتفاع في التركيز بعد أسبوع من الجرعة الأولى Fold increase					Total
		0.50	2.00	3.00	4.00	5.00	
PD	Count	4	0	0	0	0	4
	% of Total	13.3%	.0%	.0%	.0%	.0%	13.3%
SD	Count	8	1	0	0	0	9
	% of Total	26.7%	3.3%	.0%	.0%	.0%	30.0%
PR	Count	4	4	3	0	0	11
	% of Total	13.3%	13.3%	10%	.0%	.0%	36.7%
CR	Count	0	0	2	1	3	6
	% of Total	.0%	.0%	6.7%	3.3%	10.0%	20.0%
Total	Count	16	5	5	1	3	30
	% of Total	53.3%	16.7%	16.7%	3.3%	10.0%	100.0%

PD: المرض المترقّ progression disease

SD : المرض الثابت Stable disease

PR : استجابة جزئية Partial response

CR : استجابة كاملة Complete response

بلغ مجموع المرضى الذين تمت عليهم الدراسة 30 مريض/ة، كانت الإستجابة السريرية النهائية لهؤلاء المرضى للمعالجة الكيميائية المطبقة كما يلي:

● كان عدد المرضى الذين أتموا النظام العلاجي وتدهورت حالتهم وكان المرض متروكاً لديهم 4 مرضى (13.3%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى بمقدار 0.5 ضعف تقريباً عند هؤلاء المرضى.

● بينما بلغ عدد المرضى الذين أتموا النظام العلاجي ولم يحدث أي تغيير في حالتهم المرضية وبقى المرض مرض ثابت 9 مرضى (30%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى كما يلي:

- حدث ارتفاع طفيف بمقدار 0.5 ضعف عند 8 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند مريض واحد.

● بالمقابل كان عدد المرضى الذين حققوا إستجابة جزئية للنظام العلاجي المطبق 11 مريض (36.7%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار 0.5 ضعف عند 4 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند 4 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند 3 مرضى.

● وبالنهاية كان عدد المرضى الذين أتموا النظام العلاجي مع استجابة كاملة وتحسن ملحوظ 6 مرضى (20%) و كان مقدار الإرتفاع Fold increase عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى كما يلي :

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند 2 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 4 ضعف عند مريض واحد.

- حدث ارتفاع بمقدار 5 ضعف عند 3 مرضى.

ومن أجل اختبار وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين أنماط الإستجابات المختلفة المذكورة سابقاً و الإرتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى جرى تطبيق اختبار Chi-Square والذي أكد وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين الإستجابة السريرية و مقدار الارتفاع بعد أسبوع من الجرعة الأولى حيث كانت قيمة  $P$  value = 0.002.

ووفقاً لتقسيمهم للمجموعات المرضية حسب نتيجة تشريحهم المرضي فقد لاحظنا ارتفاع التركيز في المجموعة الأولى T1 المكونة من 14 مريض والخاضعين للعلاج الموضعي Doxorubicine ضمن المثانة كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار 0.5 ضعف عند 5 مرضى وكان المرض ثابت عند 4 مرضى بينما أبدى مريض واحد استجابة جزئية.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند 5 مرضى وكان المرض ثابت عند مريض واحد بينما أبدى 4 مرضى الآخرين استجابة جزئية للمعالجة.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند مريض واحد أبدى استجابة استجابة جزئية للمعالجة.

- حدث ارتفاع بمقدار 5 ضعف عند 3 مرضى أبدوا استجابة كاملة للمعالجة الكيميائية.

أما بالنسبة لمجموعة المرضى من المرحلة الثانية T2 والمؤلفة من 8 مرضى فقد كان الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار 0.5 ضعف عند 4 مرضى وكان المرض متروكاً عند مريض واحد ثابتاً عند مريضين بينما أبدى مريض استجابة جزئية.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند 3 مرضى حيث أبدى مريضين استجابة جزئية بينما أبدى مريض واحد استجابة كاملة.

- حدث ارتفاع بمقدار 4 ضعف عند مريض واحد أبدى استجابة كاملة.

أما بالنسبة لمجموعة مرضى المرحلة الثالثة T3 والمؤلفة من 8 مرضى فقد كان الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار 0.5 ضعف عند 7 مرضى وكان المرض مترقٍ عند ثلاثة منهم وثابتاً عند مريضين بينما أبدى مريضين استجابة جزئية للمعالجة الكيميائية.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند مريض واحد أبدى استجابة كاملة للمعالجة.

أيضاً قمنا بفرز الاستجابات المختلفة التي أظهرها المرضى بعد خضوعهم للمعالجة الكيميائية المطبقة مع الارتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO الناتجة بعد أسبوع من الجرعة الثالثة وكانت النتائج كما في الجدول التالي:

الجدول (٤): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الثالثة مع الاستجابة السريرية لدى مرضى سرطان المثانة

الاستجابة السريرية	مقدار الارتفاع في التركيز بعد أسبوع الجرعة الثالثة Fold increase					Total
	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	
PD Count	4	0	0	0	0	4
% of Total	13.3%	.0%	.0%	.0%	.0%	13.3%
SR Count	4	4	1	0	0	9
% of Total	13.3%	13.3%	3.3%	.0%	.0%	30.0%
PR Count	7	1	0	1	2	11
% of Total	23.3%	3.3%	.0%	3.3%	6.7%	36.7%
CR Count	1	0	4	0	1	6
% of Total	3.3%	.0%	13.3%	.0%	3.3%	20.0%
Total Count	16	5	5	1	3	30
% of Total	53.3%	16.7%	16.7%	3.3%	10.0%	100.0%

كانت الاستجابة السريرية النهائية لهؤلاء المرضى بعد خضوعهم للجرعة الثالثة من المعالجة الكيميائية كما يلي:

● كان عدد المرضى الذين أنهوا النظام العلاجي وتدهورت حالتهم وكان المرض مترقٍ لديهم 4 مرضى (13.3%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من اعطاء الجرعة الثالثة بمقدار 1 ضعف تقريباً عند هؤلاء المرضى.

● بينما بلغ عدد المرضى الذين أنهوا النظام العلاجي ولم يحدث أي تغيير في حالتهم المرضية وبقى المرض مرض ثابت 9 مرضى (30%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة كما يلي:

- حدث ارتفاع طفيف بمقدار 1 ضعف عند 4 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند 4 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 4 ضعف عند مريض واحد.

● بالمقابل كان عدد المرضى الذين حققوا إستجابة جزئية للنظام العلاجي المطبق 11 مريض (36.7%) حيث كان مقدار الارتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار 1 ضعف عند 7 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند مريض واحد.

- حدث ارتفاع بمقدار 4 ضعف عند مريض واحد.

- حدث ارتفاع بمقدار 5 ضعف عند مريضين.

● وبالنهاية كان عدد المرضى الذين أنهوا النظام العلاجي مع استجابة كاملة وتحسن ملحوظ 6 مرضى (20%) و كان مقدار الإرتفاع عند مقارنة تركيز Smac/DIABLO البدئي مع التركيز بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة كما يلي :

- حدث ارتفاع بمقدار 1 ضعف عند مريض واحد.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند 4 مرضى.

- حدث ارتفاع بمقدار 5 ضعف عند مريض واحد.

ومن أجل اختبار وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين أنماط الإستجابات المختلفة المذكورة سابقاً و الإرتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة جرى تطبيق اختبار Chi-Square والذي أكد وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين

الإستجابة السريرية و مقدار الارتفاع fold increase بعد أسبوع من الجرعة الثالثة  
حيث كانت قيمة  $P \text{ value} = 0.013$

جرى مقارنة مقدار الإرتفاع (fold increase) الحاصل في تركيز Smac/DIABLO الذي تمّ قياسه بعد أسبوع من الجرعة الأولى مع الإستجابة السريرية المقدّمة من قبل الطبيب حيث تمّ استخدام معامل الإرتباط (Spearman's) وقد تبين وجود علاقة ارتباط قوية  $r = 0.815$  بين ارتفاع التركيز والاستجابة، بينما عند دراسة علاقة الإرتباط بين مقدار الإرتفاع الحاصل في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة و الإستجابة السريرية تبين وجود علاقة ارتباط قوية ولكنها كانت أقل من سابقتها حيث كانت القيمة  $r = 0.702$ .

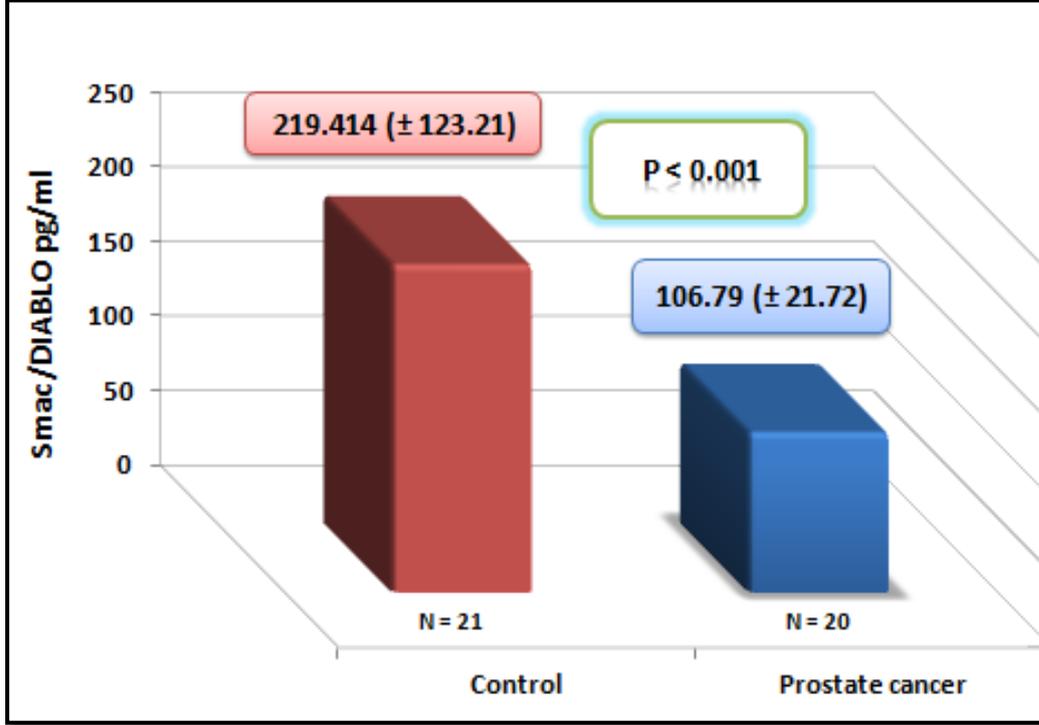
### ٢-٣ نتائج دراسة Smac/DIABLO عند مرضى سرطان البروستاتة:

١-٢-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلّي البدئي عند مجموعة المرضى وعند المجموعة الشاهدة:

تمّ قياس تركيز Smac/DIABLO عند المجموعة الشاهدة المؤلفة من 21 شخص، ومقارنته مع تركيز Smac/DIABLO البدئي قبل بدء المعالجة الهرمونية عند مجموعة مرضى سرطان البروستاتة المكونة من 20 مريض، حيث بلغت قيمة المتوسط الحسابي لتركيز Smac/DIABLO  $\pm$  الانحراف المعياري لدى المجموعة الشاهدة  $219.414(\pm 123.21)$  بيكوغرام/مل، بينما بلغت قيمة المتوسط الحسابي لتركيز Smac/DIABLO البدئي  $\pm$  الانحراف المعياري  $106.79 (\pm 21.72)$  بيكوغرام/مل لدى مجموعة المرضى.

وللمقارنة ما بين متوسط تركيز Smac/DIABLO عند المجموعة الشاهدة والتركيز البدئي عند مجموعة المرضى، تم استخدام اختبار T- student وكانت قيمة  $P \text{ value} < 0.01$  أي يوجد فارق جوهري بين تركيز Smac/DIABLO البدئي عند المرضى وتركيزه عند المجموعة الشاهدة.

ويوضح الشكل (٢٠) تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان البروستاتة.

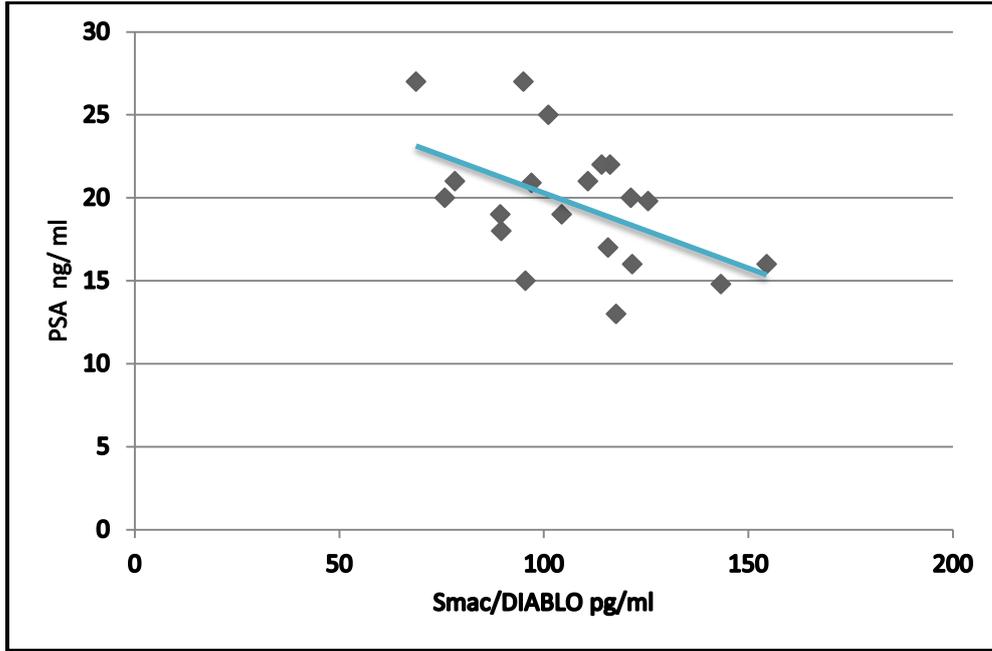


الشكل (٢٠): تراكيز Smac/DIABLO المصلية لدى المجموعة الشاهدة ومجموعة مرضى سرطان البروستاتة

٢-٢-٣ نتائج دراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي عند مجموعة المرضى وتركيز PSA:

لدراسة العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO المصلي عند مجموعة مرضى سرطان البروستاتة قبل البدء بالمعالجة الهرمونية وبين تراكيز PSA لنفس مجموعة المرضى والتي تم الحصول عليها من سجلات المرضى في المشفى، تم استخدام اختبار بيرسون Pearson Correlation وتبين وجود علاقة ارتباط عكسية متوسطة ولكنها هامة احصائياً بين التركيزين حيث كانت قيمة معامل الارتباط  $r = - 513$  وكانت قيمة P المقابلة لها  $P \text{ value} = 0.012$ .

ويوضح الشكل (٢١) العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO وتركيز PSA لدى مجموعة مرضى سرطان البروستاتة قبل البدء بالمعالجة الهرمونية.

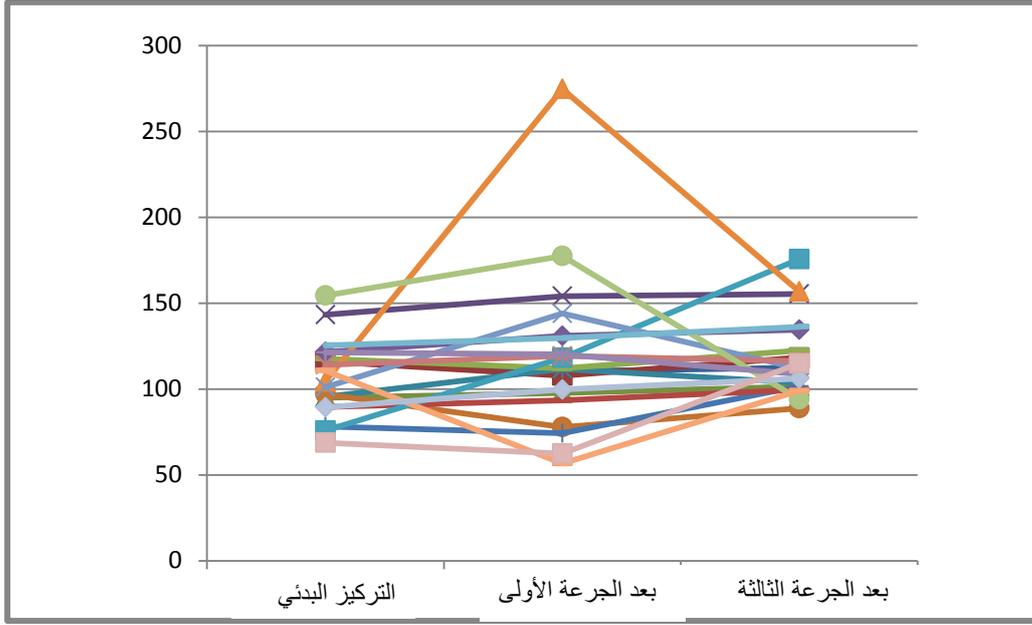


الشكل (٢١): العلاقة بين تركيز Smac/DIABLO وتركيز PSA لدى مجموعة مرضى سرطان البروستاتة

### ٣-٢-٣ نتائج دراسة علاقة الارتباط بين مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO

#### المصلي والاستجابة السريرية:

قمنا بدايةً بقياس تركيز Smac/DIABLO (بيكوغرام/مل) لكل مريض في كل مرحلة، ثمّ عمدنا إلى حساب مقدار الإرتفاع Fold increase الحاصل عند كل من : بعد أسبوع من الجرعة الأولى، و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة وقد أظهرت نتائج مقايسة Smac/DIABLO التي تمت على ثلاث مراحل لكل مريض النتائج المبينة في الشكل التالي:



الشكل (٢٢): تراكيز Smac/DIABLO المختلفة عند كل مريض خلال مراحل المعالجة ( قبل البدء بالمعالجة الهرمونية، وبعد أسبوع من الجرعة الأولى و بعد أسبوع من الجرعة الثالثة)

وبلغت قيمة المتوسط الحسابي لتراكيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى 118.65 بيكوغرام/مل، بينما كانت القيمة 117.94 بيكوغرام/مل بعد أسبوع من الجرعة الثالثة لدى مجموعة مرضى سرطان البروستاتة (20 مريض)، وبتطبيق اختبار ANOVA لم نجد فارق جوهري يعتد به احصائياً بين تركيز Smac/DIABLO البدئي لمرضى سرطان البروستاتة وبين التراكيز بعد تلقي الجرعتين حيث كانت قيمة P value =0.44.

وبعد فرزنا للاستجابات التي قدمها المرضى بعد خضوعهم للمعالجة الهرمونية والتي قُيِّمت وفقاً لنتيجة PSA لكل منهم، مع مقدار الإرتفاعات في تركيز Smac/DIABLO الناتجة بعد أسبوع من أخذ الجرعة الأولى تبين لدينا النتائج كما في الجدول التالي:

الجدول (٥): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى مع الاستجابة السريرية لدى مرضى سرطان البروستاتة

الاستجابة السريرية	مقدار الارتفاع في التركيز بعد أسبوع الجرعة الأولى			Total
	Fold increase			
	1	2	3	
SR count	1	0	0	1
% of total	5%	0%	0%	5%
PR count	3	1	0	4
% of total	15 %	5 %	0%	20%
CR count	14	0	1	15
% of total	70%	0%	5%	75%
Total count	18	1	1	20
% of total	90%	5%	5%	100%

بلغ عدد مرضى سرطان البروستاتة 20 مريض وقُسمت الاستجابة للمعالجة الهرمونية المطبقة كما يلي:

- حدث ارتفاع بمقدار ضعف واحد عند 18 مريض حيث كان المرض ثابت عند مريض واحد بينما أظهر 3 مرضى استجابة جزئية للمعالجة وأظهر 14 مريض استجابة كاملة للمعالجة.

- حدث ارتفاع بمقدار 2 ضعف عند مريض واحد أظهر استجابة جزئية للمعالجة.

- حدث ارتفاع بمقدار 3 ضعف عند مريض واحد أظهر استجابة كاملة للمعالجة.

ومن أجل اختبار وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين أنماط الإستجابات المختلفة المذكورة سابقاً و الإرتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى جرى تطبيق اختبار Chi-Square ولم نلاحظ وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين الإستجابة السريرية و مقدار الارتفاع fold increase بعد أسبوع من الجرعة الأولى حيث كانت قيمة  $P \text{ value}=0.347$ .

أيضاً قمنا بفرز الاستجابات المختلفة التي أظهرها المرضى بعد خضوعهم للمعالجة الهرمونية مع الارتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO الناتجة بعد أسبوع من الجرعة الثالثة وكانت النتائج كما في الجدول التالي:

الجدول (٦): توزع مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الثالثة مع الاستجابة السريرية لدى مرضى سرطان البروستاتة

الاستجابة السريرية	مقدار الارتفاع في التركيز بعد أسبوع الجرعة الأولى Fold increase		Total
	1	2	
SR count	1	0	1
% of total	5%	0%	5%
PR count	3	1	4
% of total	15 %	5%	20%
CR count	13	2	15
% of total	65%	10%	75%
Total count	17	3	20
% of total	85%	15%	100%

ومن أجل اختبار وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين أنماط الإستجابات المختلفة المذكورة سابقاً و الإرتفاعات في تراكيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الثالثة جرى تطبيق اختبار Chi-Square ولم نلاحظ وجود علاقة ذات دلالة إحصائية بين الإستجابة السريرية و مقدار الارتفاع fold increase بعد أسبوع من الجرعة الثالثة حيث كانت قيمة  $P \text{ value}=0.77$ .

#### ٤- المناقشة Discussion:

أظهرت دراستنا وجود فارق جوهري يُعتد به إحصائياً بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى كل من مجموعة المرضى سواء مرضى سرطان المثانة أو مرضى سرطان البروستاتة وبين تركيزه لدى المجموعة الشاهدة، حيث كانت قيمة  $P < 0.001$ ، كما أظهرت الدراسة وجود فارق جوهري بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي للمجموعة الشاهدة وبين تركيزه عند مجموعات مرضى سرطان المثانة المصنفة تبعاً لحجم الورم حيث وجدنا انخفاض في التركيز المصلي مع ازدياد حجم الورم بفارق يُعتد به إحصائياً بين كل المجموعات بقيمة  $P < 0.01$ .

وتوافقت نتائج دراستنا مع دراسة Mizutani وزملائه في اليابان لعام ٢٠١٢ والتي كانت من أوائل الأبحاث التي أشارت إلى إمكانية الكشف عن Smac/DIABLO في المصل ومن ثم تقييم فيما إذا كانت مستوياته المصلية ذات أهمية إنذارية عند مرضى السرطان، حيث سُجلت العديد من الأبحاث سابقاً في مجال التعبير عن Smac/DIABLO على مستوى الأنسجة لكنها كانت الأولى في تحديد مستوياته المصلية عند مرضى سرطان المثانة، حيث تناولت دراسته 173 مريض سرطان مثانة و36 شخص سليم وأظهرت أن متوسط التراكيز المصلية لبروتين Smac/DIABLO عند مرضى سرطان المثانة كان أقل بضعفين تقريباً من متوسط التراكيز عند الأسوياء، وأن متوسط التركيز يرتبط ارتباطاً عكسياً مع درجة ومرحلة تطور الورم. وقد أظهرت هذه الدراسة اليابانية للمرة الأولى أنه يُعد المستوى المصلي المرتفع من Smac/DIABLO عامل إنذاري جيد عند مرضى السرطان. وتبقى الآلية غير واضحة بشكل كافي، ولكن على اعتبار أن Smac/DIABLO بروتين تنظيمي استماتي، فمن الممكن أن تكون مستوياته المصلية المرتفعة ناتجة عن تحرره من الخلايا الخاضعة للاستماتة. وعلى النقيض، فإن مستوياته المصلية المنخفضة ممكن أن تعكس هروب الخلايا الورمية من الاستماتة وبالتالي عامل إنذاري سيء للمرض. (٧٧)

أيضاً توافقت دراستنا مع دراسة Dobrzycka وزملائه في بولندا لعام ٢٠١٥ والتي كانت ثاني دراسة مصلية داعمة لسابقتها عن وجود بروتين Smac/DIABLO في المصل، وأنه من الممكن أن يتنبأ المستوى المصلي عن نتيجة سريرية تشخيصية وأن

المستويات المنخفضة تكون مترافقة مع إنذار سيء لسرطان المبيض حيث تتحرر كميات منخفضة من Smac/DIABLO إلى الدوران كلما كان الورم أكبر حجماً.<sup>(٩٤)</sup>

وكانت دراستنا هي الدراسة المصلية الأولى التي أجريت على مرضى سرطان بروتينات سورين، وقد أظهرت انخفاض للمستويات المصلية عند المرضى مقارنة مع الأسوياء، وأيضاً يمكن القول بأن وجوده في الدوران قد يعود للموت الخلوي الطبيعي الذي تخضع له الخلايا الطبيعية أو الورمية لذلك تتناسب مستوياته المصلية عكساً مع درجة تطور الورم ومرحلته. وعلى اعتبار أن قياس تراكيز PSA عند مرضى سرطان البروستاتة يُعد أداة تشخيصية هامة، فقد قمنا بدراسة علاقة الارتباط بين تركيز Smac/DIABLO المصلي مع تركيز PSA عند مجموعة المرضى ووجدنا علاقة ارتباط عكسية بينهما، أي أنه كلما ارتفع تركيز PSA عند المرضى كلما كان هناك انخفاض في تركيز Smac/DIABLO المصلي، لذلك من الممكن اعتبار Smac/DIABLO واصم ومنتابطة إنذارية مساعدة في تشخيص السرطان وتحديد مرحلة الورم ولاسيما عند مرضى سرطان المثانة لعدم وجود واصمات نوعية للمرض.

ومن الجدير بالذكر أن دراستنا المصلية تُعتبر الدراسة المصلية الأولى التي أجريت على مرضى السرطان خلال مراحل المعالجة والتي تم فيه ربط تركيز Smac/DIABLO المصلي مع الاستجابة للمعالجة المطبقة، حيث استخدمت معظم الدراسات العالمية عينات نسيجية في أبحاثها ودرست التعبير عنه على مستوى النسيج لذلك:

قمنا في دراستنا بالتحري عن العلاقة بين الارتفاع في تراكيز Smac/DIABLO عند مرضى سرطان المثانة والاستجابة السريرية النهائية المقدمة من قبل الطبيب حيث أظهرت الدراسة بدايةً علاقة ارتباط قوية بين مقدار الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى (fold increase) والاستجابة السريرية النهائية حيث كانت قيمة معامل الارتباط  $r = 0.815$  والتي تنخفض إلى  $r = 0.702$  التي تُظهر بالمقابل الارتباط بين مقدار الارتفاع في التركيز بعد اسبوع من الجرعة الثالثة (fold increase) والاستجابة السريرية النهائية المقدمة من الطبيب.

وبالتالي يعتبر مقدار الارتفاع الحاصل في تركيز Smac/DIABLO الذي تمّ قياسه بعد أسبوع من الجرعة الأولى مؤشراً أفضل من مقدار الارتفاع (fold increase) الحاصل

بعد أسبوع من الجرعة الثالثة، ويمكن الاعتماد عليه في استنتاج الإستجابة المبكرة للمريض للمعالجة الكيميائية والتنبؤ بإمكانية إتمام النظام العلاجي أو إيقافه.

كذلك أظهرت دراستنا التي أجريت على مرضى سرطان المثانة أنّ ارتفاع تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى من 0.5 ضعف إلى 5 ضعف يمكن أن يكون مؤشر على أنّ المريض سيبدى إستجابة كاملة CR أو إستجابة جزئية PR للمعالجة الكيميائية، أي أنّ المرضى الذين حصل عندهم ارتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى بمقدار أكثر من ضعفين يمكن أن يكون مؤشر بأنّ هؤلاء المرضى لديهم إحتمال كبير للإستجابة للمعالجة الكيميائية المطبقة ولاحقاً الشفاء من المرض، بينما المرضى الذين حصل لديهم تغير طفيف في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى بمقدار من 0.5 ضعف إلى 2 ضعف فهذا يعتبر مؤشر على ترقي المرض عند المريض أو ثباته، ويمكن التنبؤ بأن المريض لن يستجيب للمعالجة الكيميائية، ويفضل إيقاف النظام العلاجي المستخدم واستبداله بنظام آخر جديد وبالتالي تجنب المريض خطر الآثار الجانبية للعلاج الحالي وتوفير كلّ من الوقت والجهد و الكلفة الإقتصادية.

وأيضاً بينت دراستنا وجود فارق جوهري بين تركيز Smac/DIABLO البدئي عند مجموعة المرضى وبين تركيزه بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى (متوسط تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من الجرعة الأولى 197.9 بيكوغرام/مل)، وهذا يؤكد حدوث تفعيل لعملية الإستماتة التي تعمل على قتل الخلايا الورمية وإنقاص حجم الورم وبالتالي تحسّن حالة المريض، حيث أنّ الإرتفاع في تركيز Smac/DIABLO بعد أسبوع من إعطاء الجرعة الأولى يؤكد ذلك، بينما نلاحظ ارتفاع طفيف جداً في تركيز Smac/DIABLO عند المرضى الغير مستجيبين أو عند المرضى الذين كان المرض لديهم ثابت وبالتالي قد يشير ذلك إلى حصول تعطيل في عملية الإستماتة عندهم، مما يعود و يؤكد أهمية Smac/DIABLO و دوره في تقييم إستجابة المرضى للمعالجة الكيميائية، وإمكانية استخدامه كعامل مساهم للتنبؤ باستجابة المريض أو مقاومته للمعالجة، وهذا أيضاً ما وجدته دراسة Mizutani وزملائه في اليابان لعام ٢٠١٠ والتي أجريت على عينات نسيجية من مرضى سرطان مثانة بعد معالجتهم بدواء Cisplatin حيث وجد أن التعبير المنخفض عن Smac/DIABLO يكون مترافق مع مقاومة للمعالجة الدوائية.<sup>(٧٦)</sup>

كما أظهرت دراستنا التي أجريت على مرضى سرطان البروستاتة عدم وجود علاقة ارتباط هامة بين الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO المصلي بعد أسبوع من الجرعة الأولى للمعالجة الهرمونية وبين الاستجابة النهائية السريرية عند المرضى، كذلك أظهرت عدم وجود علاقة ارتباط هامة بين الارتفاع في تركيز Smac/DIABLO المصلي بعد أسبوع من الجرعة الثالثة وبين الاستجابة النهائية السريرية عند مجموعة المرضى.

يُمكن أن يفسر هذا الاختلاف في وجود علاقة بين ارتفاع تراكيز Smac/DIABLO والاستجابة عند مرضى سرطان المثانة، وبين ارتفاع تراكيزه والاستجابة عند مرضى سرطان البروستاتة باختلاف النظام العلاجي المطبق بين المجموعتين حيث خضع مرضى سرطان المثانة للمعالجة الكيميائية بينما خضع مرضى سرطان البروستاتة للمعالجة الهرمونية.

تلعب الأدوية الكيميائية دوراً هاماً في معالجة الخلايا السرطانية معتمدة على عدة آليات أهمها تحريض الاستماتة عبر سبيلها الداخلي من خلال زيادة تحرير بروتينات الاستماتة مثل cytochrome c و Smac/DIABLO من المتقدرة وبالتالي تفعيل caspase-3 و caspase-9 للقيام بدورها.

فقد أظهرت دراسة Mizutani وزملائه في اليابان لعام ٢٠١٠م والتي أجريت على عينات نسيجية من مرضى سرطان مثانة أنه يزداد تحرر البروتين الاستماتي Smac/DIABLO من المتقدرة إلى العصارة الخلوية وذلك استجابة إلى تحريض الاستماتة الناتج عن العوامل العلاجية الكيميائية Cisplatin و Doxorubicin (adriamycin)<sup>(٧٦)</sup>، كما وجد Arnt أن الحموض الأمينية الأربعة المشكلة لمنطقة IBM في Smac/DIABLO تزيد الاستماتة في الخطوط الخلوية المعالجة بكل من Paclitaxel، Doxorubicine، Camptothecin و Etoposide<sup>(٩٥)</sup>.

كما أظهرت دراسة Qin وزملائه في الصين عام ٢٠١٢م أن المعالجة الكيميائية (Bortezomib) تقوم بتفعيل caspase-3 و caspase-9 وتحرير بروتين الاستماتة Smac/DIABLO مؤدية إلى حدوث الاستماتة في خلايا سرطان الرئة وكذلك استخدمت دراسته عينات نسيجية<sup>(٧١)</sup>.

كما يعمل Paclitaxel بشكل أساسي على تفعيل السبيل الداخلي للاستماتة عند مريضات سرطان الثدي، مما دفع العديد من الأبحاث إلى دراسة المقاومة التي تبديها الخلايا السرطانية مؤدية إلى فشل المعالجة وذلك نتيجة وجود خلل في السبيل الداخلي الاستماتة وبروتيناتها. (٩٦)

أما بالنسبة للمعالجة الهرمونية فكما ذكرنا سابقاً أنها تهدف إلى تقليل مستويات الهرمونات الذكرية في الجسم أو منعهم من الوصول إلى خلايا البروستاتة السرطانية، حيث يتحرض نمو غدة البروستاتة بشكل أساسي بتحريض من هذه الهرمونات الذكرية لذلك فإن تقليل مستوياتها سوف يساعد في محاربة السرطان.

لذلك تعتمد المعالجة الهرمونية في عملها إما على إيقاف إنتاج هذه الهرمونات أو حجب المستقبلات الهرمونية، حيث ينحصر عملها على المستوى الهرموني دون التدخل في سبل الاستماتة ضمن الخلية.

يُصنف دواء Casodex كعلاج هرموني مضاد اندروجيني يقوم بكبح التأثيرات الناتجة عن هرمون التستوسترون في زيادة حجم غدة البروستاتة والتي تعتمد عليه الغدة بشكل أساسي في زيادة حجمها وبالتالي فإن تخفيض كمية التستوسترون المنتجة سيؤدي إلى تقليل حجم الورم وتراجعها، وهذا ما يقوم Casodex بفعله في المعالجة مما جعلنا نفسر عدم وجود علاقة هامة بين ارتفاع تراكيز Smac/DIABLO عند مرضى سرطان البروستاتة وبين استجابتهم للمعالجة الهرمونية المطبقة بأن هذا النمط من المعالجة لا يتدخل ضمن آليته في سبل الاستماتة أو زيادة تحريضها أو تحرير بروتينات الاستماتة وإنما تتجلى آلية عمله في التأثير على المستويات الهرمونية التي تتحكم في زيادة حجم وتغذية غدة البروستاتة. (٩٧)

## ٥- الاستنتاجات Conclusion:

يدعم قياس مستويات Smac/DIABLO المصلية في الكشف عن السرطان وتحديد مراحل تطوره إلى جانب التحاليل والفحوصات الأخرى:

- حيث تنخفض مستوياته المصلية عند مرضى السرطان مقارنة مع الأشخاص الأسوياء
- كما تنخفض مستوياته المصلية بشكل أكبر كلما كان الورم متقدماً

ويدعم قياس مستويات Smac/DIABLO المصلية عند مرضى السرطان خلال مراحل المعالجة في مراقبة مدى فعالية المعالجة الكيميائية المطبقة واعتبار Smac/DIABLO واصم جيد في التنبؤ بالمقاومة والحساسية تجاه المعالجة الكيميائية:

- حيث يعتبر ارتفاع التركيز بعد أسبوع من الجرعة الأولى لأكثر من ضعفين مؤشر جيد على استجابة المرضى بشكل كامل أو جزئي للمعالجة.
- كما يعتبر ارتفاع التركيز بمقدار خفيف أو عدم ارتفاعه بعد أسبوع من الجرعة الأولى عامل إنذار سيء للمرض.

## ٦- التوصيات والمقترحات :Recommendation and suggestions:

استناداً إلى النتائج التي توصلنا إليها نوصي مايلي:

- اجراء دراسات مصلية أوسع للتحري عن تركيز Smac/DIABLO عند مختلف مرضى السرطان بكافة أشكاله على اعتبار أنه بروتين غير نوعي لسرطان محدد.
- اجراء دراسات مصلية أوسع وأشمل للتحري عن تغير تركيز Smac/DIABLO خلال مراحل المعالجة عند المرضى نظراً لقلتها.
- اعتبار Smac/DIABLO مشعر تشخيصي إنذاري في كشف السرطان وتحديد مرحلة الورم.
- اعتبار Smac/DIABLO عامل مفيد في التنبؤ بالاستجابة للمعالجة الكيميائية المطبقة وذلك في مرحلة مبكرة من المعالجة.

## ٧- الملخص Abstract:

**الخلفية:** تلعب الاستماتة وبروتيناتها دوراً هاماً في المحافظة على التعداد الخلوي الطبيعي في أنسجة الجسم وبالتالي منع حدوث السرطان في هذه الأنسجة، وقد ظهر مؤخراً بروتين الاستماتة Smac/DIABLO الذي هو عبارة عن بروتين متقدي يتحرر من المتقدرة إلى العصارة الخلوية خلال تفعيل شلال الاستماتة ويرتبط مع البروتينات المثبطة للاستماتة ملغياً فعاليتها وبالتالي حدوث الاستماتة، وتوجهت الأبحاث مؤخراً إلى دراسة أهمية هذا البروتين في دعم التشخيص المؤكد للسرطان إلى جانب الاختبارات الأخرى، بالإضافة إلى دوره في مراقبة المعالجة التي يخضع لها المرضى ومدى فعاليتها.

لذلك هدفت الدراسة إلى تعيين الأهمية التشخيصية الإنذارية للمستويات المصلية لبروتين Smac/DIABLO في تشخيص السرطان بشكل عام وسرطان البروستاتة وسرطان المثانة خاصة، وتقييم فعالية الاستجابة السريرية من خلال ربطها مع معدل ارتفاع Smac/DIABLO بعد كل من الجرعة الأولى والثالثة من المعالجة الكيميائية والهرمونية.

**الطرق:** قيست المستويات المصلية لبروتين Smac/DIABLO لدى مجموعة الأسوياء الشاهدة (٢١ فرداً)، ولدى كل من مجموعة مرضى سرطان المثانة (٣٠ مريضاً) ومجموعة سرطان البروستاتة (٢٠ مريض) وذلك على ثلاث مراحل: قبل البدء بالمعالجة ثم بعد أسبوع من الجرعة الأولى من المعالجة وبعد أسبوع من الجرعة الثالثة من المعالجة، باستخدام مقايصة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم ELISA.

**النتائج:** أظهرت الدراسة وجود فارق يعتد به احصائياً بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى مجموعة مرضى سرطان المثانة و بين تركيزه لدى المجموعة الشاهدة حيث كانت قيمة  $P < 0.00$  وكذلك لاحظت الدراسة وجود فارق يعتد به احصائياً بين تركيز Smac/DIABLO المصلي البدئي لدى مجموعة مرضى سرطان البروستاتة وبين تركيزه لدى المجموعة الشاهدة، كما أظهرت وجود علاقة ارتباط قوية بين معدل ارتفاع تركيز Smac/DIABLO والاستجابة السريرية النهائية للمعالجة الكيميائية.

**الاستنتاج:** تقترح الدراسة أن Smac/DIABLO مفيد كمتنابطة إنذارية مساعدة في تشخيص سرطان البروستاتة والمثانة، كما يعتبر واصم جيد في التنبؤ المبكر للمقاومة أو الحساسية تجاه المعالجة الكيميائية المطبقة.

**Abstract:**

**Background:** Apoptosis and apoptotic proteins play a significant role in the maintenance of the normal cellular number in body's tissues and prevent cancer formation in these tissues. Recently, researchers discovered Smac/DIABLO which is a mitochondrial protein released from mitochondria to the cytosol during the activation of apoptosis and interacts with Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) leading to the inhibition of the capase-binding activity of IAPs. Recently, many research studies have supported a major role for this protein in cancer diagnosis and monitoring of treatment.

So, the aim of the study was to determine the prognostic diagnostic importance of measuring serum levels of Smac/DIABLO in cancer diagnosis and to evaluate the efficacy of clinical response.

**Methods:** Serum levels of Smac/DIABLO were measured in 21 control cases, 20 patients with Prostate cancer and 30 patients with Bladder cancer, before treatment, after the first dose and after the third dose, using enzyme-linked immunosorbent Assay ELISA.

**Results:** We found that serum levels of Smac/DIABLO were significantly decreased in patients with prostate cancer and bladder cancer compared to the control group ( $p < 0.001$ ). and also found a strong correlation between the fold increase in

serum levels of Smac/DIABLO in bladder cancer patients and the final clinical response to chemotherapy.

**Conclusion:** Our findings suggest that measuring the levels of Smac/DIABLO in the serum may be considered as a prognostic and diagnostic parameter in patients with prostate cancer and bladder cancer, and it suggests that Smac/DIABLO is useful as predictive factor for chemotherapy resistance.

**Key words:** Smac/DIABLO, cancer, diagnosis, treatment.

## ٨- المراجع :References

1. World Health Organization Fact sheets, Cancer, 2014 February, N°297
2. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C and Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2014. *Ann Oncol*, 2014 Mar 25: 1650-1656.
3. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C and Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*, 2013 Jan 1;24(3):792-800.
4. World Health Organization- Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles, 2014.
5. Salim EI, Moore MA, Al-Lawati JA, Al-Sayyad J, Bazawir A, Bener A, Corbex M, El-Saghir N, Habib OS, Maziak W, Mokhtar HC, Seif-Eldrin IA, Sobue T. *Cancer epidemiology and control in the arab world - past, present and future. Asian Pac J Cancer Prev. 2009 Jan-Mar;10(1):3-16.*
6. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011 Mar-Apr and 61(2):69-90.
7. Shamseddine A, Saleh A, Charafeddine M, Seoud M, Mukherji D, Temraz S, Sibai AM. Cancer trends in Lebanon: a review of incidence. *rates for the period of 2003-2008 and projections until 2018. Popul Health Metr*, 2014 Mar 4;12(1):4.
8. Mzayek F, Asfar T, Rastam S and Maziak W. Neoplastic Diseases in Aleppo, Syria. *Eur J Cancer Prev. 2002 Oct;11(5):503-507.*
9. Ghobrial IM, Witzig TE and Adjel AA. Targeting apoptosis pathways in cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:178–194.
10. Mizutani Y, Katsuo Y and Bonavida B, Prognostic significance of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO) expression in bladder cancer and target for therapy. *Int j oncol* 2010; 37: 503-508.

11. Davis WW, Potosky AL and Hoffman RM. Five-year outcomes after prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer: The Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96: 1358-1367
12. Sheldon H and Marks S. Prostate and cancer 2009.
13. Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast TH, Wiegel T and Zattoni F. Guidelines on Prostate Cancer, European Association of Urology 2010: 16-17.
14. Thompson I and Thrasher JB, Prostate cancer. American Urological Association Education and Research. *Inc*,2006:6.
15. Jansen FH, Roobol M, Jenster G, Schroder FH and Bangma CH, Screening for Prostate Cancer in 2008 II: The Importance of Molecular Subforms. of Prostate-Specific Antigen and Tissue Kallikreins, *European urology* 55 (2009 ): 563–574.
16. Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, and Partin AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *Annu. Rev. Med.* 2009. 60: 139–151.
17. Edge SB, Byrd DR and Compton CC. AJCC Cancer Staging. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010.
18. Falzarano SM, Zhou M and Hernandez AV. Stage Migration In Prostate Cancer At Radical Prostatectomy During The PSA Era Is Associated With Relatively Constant Gleason Score. *United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP/IAP)*, 99th Annual Meeting. Washington, DC, 2010.
19. Falzarano M, MD\*w and Magi-Galluzzi C. Prostate Cancer Staging and Grading at Radical Prostatectomy Over Time. *Adv Anat Pathol*, 2011;18,(2): 159-164.
20. Lin DW, Porter M and Montgomery B. Treatment and survival outcomes in young men diagnosed with prostate cancer: a population-based cohort study. *Cancer*, 2009;115: 2863–2871.
21. Potosky AL, Davis WW, Hoffman RM. Five-year outcomes after prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer: The Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96: 1358-1367.

22. Meng MV. Treatment of patients with high risk localized prostate cancer: results from cancer of the prostate strategic urological research endeavor (CaPSURE). *J Urol*, 2005 May; 173(5): 1557–1561.
23. Lu-Yao GL, Albertsen PC and Moore DF. Survival following primary androgen deprivation therapy among men with localized prostate cancer. *JAMA*, 2008;300: 173- 181.
24. Nelson CJ, Lee JS, Gamboa MC and Roth AJ. Cognitive effects of hormone therapy in men with prostate cancer: A review. *Cancer*. 2008;113: 1097-1106.
25. Lorenzo G and Autorino R. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients. *Eur Urol*, 2007 Aug;52(2): 613-614.
26. Beer TM, Pierce WC, Lowe BA and Henner Wd. Phase II study of weekly docetaxel in symptomatic androgen independent prostate cancer. *Ann Oncol*, 2001;(12): 1273-1279.
27. Ploeg M, Aben Kh and kiemeny La. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*, 2009;27: 289-293.
28. Parekh DJ et al. Superficial and muscle-invasive bladder cancer: principles of management for outcomes assessments. *J Clin Oncol*, 2006 Dec 10;24(35): 5519–5527.
29. Mowatt G, Ndow J, Vale L, Nabi G, Boachi C, Cook JA and Fraser C. photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: systematic review and meta analysis. *Int J Technol Assess*, 2011;27: 3-10.
30. Sobin LH, Gospodariwicz M and Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. *UICC*, 2009: 262-265.
31. Mdeb R, Golijanin D, Noyes K, Fisser S and Knoof J. tratmrnt of nonmuscule invading bladder cancer: the use and economic implications of intravesical chemotherapy after transurethral resection of bladder tumor. *Cancer*, 2009;115: 2660-2670.

32. Lerner SB and Au J. risk adapted use of intravesical chemotherapy. *BJU Int*, 2008;102: 1247-1253.
33. Cheung G, Sahai A, Billia M and Khan MS. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Med*, 2013;(17):11-13.
34. Sternberg CN. Chemotherapy for bladder cancer: treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer. *Urology*, 2007 Jan;69(1 Suppl): 62–79.
35. Perl M, Chung CS and Ayala A. Apoptosis. *Crit Care Med* 2005;33(12, suppl): 526–529.
36. O'Brien M, DVM and Kibry R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Vet Emerg Crit Care*, 2008; 18(6): 572–585.
37. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 2007; 35(4):495–516.
38. Ziegler U and Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004; 19:124–128.
39. Proskuryakov S, Gabai Vand Konoplyannikov A. Immunology of apoptosis and necrosis. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70(12):1310–1320.
40. Power C, Fanning N and Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock* 2002; 18(3):197–211.
41. Taylor RC, Cullen SP and Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev* 2008; 9:231–241.
42. Baba A. Apoptosis and Necrosis. *XLII* 2009; 2: 347-359.
43. Ghobrial IM, Witzig TE and Adjel AA. Targeting apoptosis pathways in cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:178–194.
44. Power C, Fanning N and Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock* 2002; 18(3):197–211.
45. Watanabe N, Ikuta K and Nisitani S. Activation and differentiation of autoreactive b-1 cells by interleukin 10 induce autoimmune

- hemolytic anemia in Fas-deficient antierythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* 2002; 196(1):141–146.
46. Fulda S and Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25:4798–4811.
47. Coultas L and Stasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:115–123.
48. Wong RSY. Apoptosis in Cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011 Sep 26;1-14.
49. Klener P, Andera L, Necas E and Zivny J. Cell Death Signalling Pathways in the Pathogenesis and Therapy of Haematologic Malignancies: Overview of Apoptotic Pathways. *Folio biologic praha*, 2006; 52:34-44.
50. Mandal M, Borowski C, Palomero T, Ferrando AA, Oberdoerffer P, Meng F, Ruiz-Vela A, Ciofani M, Zuniga-Pflucker JC, Screpanti I, Look AT, Korsmeyer SJ, Rajewsky K, von Boehmer H and Aifantis I. The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J EXP MED*, 2005 Feb 21;201(4):603-614.
51. Power C, Fanning N and Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock* 2002; 18(3):197–211.
52. Fadeel B and Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Int Med* 2005; 258(6):479–517.
53. Dewson G and Kluc RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2010 Apr;2:9-22.
54. Arican G. Apoptosis signaling: A life or death decision. *Advan mol bio* 2008;(2):57-66.
55. Wei Y, Fan T and Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008 Apr;40(4):278-288.
56. Brown M, He K and Yu J. Cell death signaling in cancer biology and treatment. Smac IAP addiction in cancer. Ed: Daniel E. Johnson . Pub: Humana Press, Totowa 2013, NJ; 255 – 279.

57. Fink SL and Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 2005 Apr; 73(4):1907-1916.
58. Bai L and Zhu WG. P53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol*, 2006; 2(4):141-153.
59. Lavrik I, Golks A and Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci*, 2005 Jan 15;118(Pt 2):265-267.
60. Verweij J, Therasse P, Eisenhauer E and RECIST working group. Cancer clinical trial outcomes: any progress in tumour-size assessment?. *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):225-227.
61. Hamilton G. Cytokeratin 18 (CK18) and Caspase-Cleaved CK18 (ccCK18) as Response Markers; in "Anticancer Therapy in "Cytokeratins – Tools in Oncology"; Ed. Hamilton G; Pub. InTech Europe, 2012:135-158.
62. Eisenhauer AE, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz HL, Sargent D, Ford J, Dancey S, Arbuck S, Gwyther M, Mooney L, Rubinstein L, Shankar R, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D and Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009 ;45:228 –247.
63. Therasse P, Eisenhauer EA and Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur J Cancer*, 2006;42:1031–1039.
64. Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP and Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008 Sep 26;27:48.
65. Du C, Fang M, Li Y, Li L and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000 Jul 7;102(1):33-42.
66. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM and Reid GE. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000; 102:43–53

67. Ceballos G and Melendes J. Gene section review: DIABLO (Diablo, IAP binding mitochondrial protein). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2013; 17 (7): 478-482.
68. J.J. Chai, C.Y. Du, J.W. Wu, S. Kyin, X.D. Wang and Y.G. Shi. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 2000 Aug 24; 406(6798): 855-862.
69. Shiozaki EN and Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci*, 2004 Sep;29(9): 486-494.
70. Shi, Y. () A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ*, 2002; (9):93–95.
71. Qin S, Yang C, Li S, Xu C, Zhao Y and Ren H. Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment. *Cancer Lett*, 2012 May 1;318(1): 9-13.
72. Gao Z, Tian Y, Wang J, Yin Q, Wu H, Li YM and Jiang X. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo. *J Biol Chem*, 2007 Oct 19;282(42): 30718-27.
73. D. Chauhan, G.L. Li, T. Hideshima, K. Podar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, N. Munshi, S. Kharbanda and K.C. Anderson. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells, *J Biol Chem*, 2003 May 16;278(20): 17593–17596.
74. Kashkar H, Seeger JM, Hombach A, Deggerich A, Yazdanpanah B, Utermöhlen O, Heimlich G, Abken H and Krönke M. XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack. *Blood*, 2006 Nov 15;108(10): 3434-3440.
75. Bao ST, Gui SQ and Lin MS: Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5(4): 580-583.
76. Mizutani Y, Katsuo Y and Bonavida B. Prognostic significance of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/DIABLO)

- expression in bladder cancer and target for therapy. *Int j oncol* 2010;(37): 503-508.
77. Mizutani Y, Katsuoka Y and Bonavida B. Low circulating serum levels of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac/Diablo) in patients with bladder cancer. *int j oncol* 2012,(40): 1246-1250.
78. Pluta P, Cebula-Obrzut B, Ehemann V, Pluta A, Wierzbowska A, Piekarski J, Bilski A, Nejc D, Kordek R, Robak T, Smolewski P and Jeziorski A. Correlation of Smac/DIABLO protein expression with the clinico-pathological features of breast cancer patients. *Neoplasma*, 2011;58(5): 430-435.
79. Mansour A, Nabil M, Ali-Labib R, Said H and Annos F. Reciprocal expression of survivin and SMAC/DIABLO in primary breast cancer. *Med Oncol*, 2012 Dec;29(4): 2535-2542.
80. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Bernaczyk PS, Garbowicz M, Niklinski J, Chyczewski L and Kulikowski M. Prognostic significance of smac/DIABLO in endometrioid endometrial cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010 Dec;48(4): 678-681.
81. Wang HX, Chen G, Li GL and Jiang YJ. Expression and significance of Survivin and Smac in ovarian mucinous tumors. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2010 Jun;39(6): 387-390.
82. Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayach Y, Sasaki H, Yano M and Fujji Y. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer, *J clin Oncol*, 2004;(11): 797-802.
83. Dai C, Li J, Shi S, Yu L, Ge L and Chen P. Survivin and Smac Gene Expressions but not Livin Are Predictors of Prognosis in Non-small Cell Lung Cancer Patients Treated with Adjuvant Chemotherapy Following Surgery. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(4): 327–335.
84. Endo K, Kohnoe S, Watanabe A, Tashiro H, Sakata H, Morita M, Kakeji Y and Maehara Y. Clinical significance of Smac/DIABLO expression in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2009 Feb;21(2):351-355.

85. Kempkensteffen C, Hinz S, Jäger T, Weikert S, Krause H, Schostak M, Christoph F, Strenziok R, Miller K and Schrader M. Expression levels of the IAP antagonists XAF1, Smac/DIABLO and HtrA2 in testicular germ cell tumours. *Aktuelle Urol*, 2008 Nov;39(6): 436-341.
86. Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, Okihara K, Kawauchi A, Bonavida B and Miki T. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol*, 2005 Jan 20;23(3): 448-454.
87. Fandy TE, Shankar S and Srivastava RK. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol Cancer*, 2008 Jun 30;7:60.
88. Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG. A small molecule Smac mimic potentiates T. *Science*, 2004; 305: 1471–1474.
89. Wist AD, Gu L, Riedl SJ, Shi Y and McLendon GL. Structure-activity base study of the Smac-binding pocket within the BIR3 domain of XIAP. *Bioorg Med Chem*, 2007; 15: 2935–2943.
90. Chen DJ and Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anti-Cancer Drugs*, 2009; 20: 646–658.
91. Bilim V, Yuuki K, Itoi T, Muto A, Kato T, Nagaoka A, Motoyama T and Tomita Y. Double inhibition of XIAP and Bcl-2 axis is beneficial for retrieving sensitivity of renal cell cancer to apoptosis. *Br J Cancer*, 2008 Mar 11;98(5): 941-949.
92. T. Mori, R. Doi, A. Kida, K. Nagai, K. Kami, D. Ito, E. Toyoda, Y. Kawaguchi and S Uemoto. Effect of the XIAP inhibitor embelin on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *J Sur Res*, 2007; (142): 281–286.
93. Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H and Yamori T. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of

- a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*, 2003; 63:831–837.
94. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Bernaczyk PS, Garbowicz M, Niklinski J, Chyczewski L and Kulikowski M. Prognostic significance of pretreatment VEGF, survivin, and Smac/DIABLO serum levels in patients with serous ovarian carcinoma. *Tumor Biol*, 2015.
95. Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrant MP, Gores GJ and Kaufmann SH. Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J Biol Chem*, 2002;(277): 44236-44243.
96. Kutuk O and Letai A. Alteration of the mitochondrial apoptotic pathway is key to acquired Paclitaxel resistance and can be reversed by ABT-737. *Cancer Res*, 2008;(19): 7985-7994.
97. Lee JS, Gamboa MC and Roth AJ. Effects of hormone therapy in men with prostate cancer: A review. *Cancer*. 2008;113: 1097-1106.