

## ارتباط تعبيرية واسمات الخلايا الجذعية السرطانية في سرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث عند الهامستر في سياق المعالجة الشعاعية

رهام الصفدي<sup>1</sup>، أ.د. أحمد المنديلي<sup>2</sup>

<sup>1</sup> طالب دكتوراه في قسم النسيج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان - جامعة دمشق  
E-mail: [reham92.safadi@damascusuniversity.edu.sy](mailto:reham92.safadi@damascusuniversity.edu.sy)  
<sup>2</sup> أستاذ في قسم النسيج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان - جامعة دمشق

### الملخص:

خلفية البحث وهدفه: يعتبر سرطان شائك الخلايا الفموي من أكثر الأورام شيوعاً ويتميز بالنكس المتكرر والغزو، وأظهرت العديد من الأدلة أن النكس وتشكيل النقائل يرتبطان بوجود الخلايا الجذعية السرطانية (CSCs) ومقاومتها للعلاج، وهي أهم مجموعة خلوية قادرة على الهجرة والغزو. ومن واسمات CSCs في OSCC: CD44، ALDH1A1. الهدف من البحث: تحري تعبيرية CD44، ALDH1A1 في سرطان شائك الخلايا الفموي OSCC بعد استحداثه عند الهامستر ثم تطبيق المعالجة الشعاعية ومقارنته قبل وبعد المعالجة للتحقق من تأثير هذه الواسمات بالمعالجة الشعاعية ومدى الاستجابة الشعاعية للخلايا الورمية.

مواد وطرائق البحث: تألفت عينة البحث من 36 هامستر حيث انقسمت إلى (18 عينة من الهامسترات المستحدث لديهم OSCC و18 عينة من الهامسترات المستحدث لديهم OSCC ثم تم تطبيق المعالجة الشعاعية بجرعة (هامستران Gy10 - هامستران Gy20 - 14 هامستر Gy30)) وتم أخذ خزعات من الجيب الخدي اليمين وتثبيتهم بالفورمالين ودمجهم بشمع البارافين وتلوينهم بالهيماتوكسيلين-إيوزين تقليدياً ومناعياً بالأضداد وحيدة النسيلة CD44، ALDH1A1 من شركة Biosb

النتائج: أظهرت هذه الواسمات تعبيرية إيجابية في كامل العينة وتراوحت بين المتوسطة والمرتفعة في سرطان شائك الخلايا الفموي قبل وبعد المعالجة الشعاعية وأبدت العديد من الجزر والخلايا الورمية مقاومة للاستجابة الإشعاعية حتى بعد تلقي Gy 30 ووجدنا بعد

تاريخ القبول: 2022/1/24

تاريخ النشر: 2023/3/5



حقوق النشر: جامعة دمشق -  
سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق  
النشر بموجب الترخيص  
CC BY-NC-SA 04

التلوين المناعي انخفاض في نسبة العينات الآخذة للتعبيرية المرتفعة بعد المعالجة، ولكن بفوارق غير دالة إحصائياً، كما ظهر لدينا ارتباط بين هذين الواسمين بعلاقة طردية متوسطة قبل المعالجة ومرتفعة بعد المعالجة.

الاستنتاجات: إن وجود مقاومة للخلايا الورمية للعلاج الإشعاعي قد يعود لوجود هذه التعبيرية الإيجابية لواسمات الخلايا الجذعية السرطانية حيث لم تعطي حساسية شعاعية عالية وقد منعت من تلف DNA أثناء العلاج وبهذا يكمن أهمية إيجاد علاج داعم باستخدام يستهدف هذه الواسمات مع المعالجة الشعاعية للوصول إلى معالجة أفضل، وإن ارتباط هذين الواسمين قد يساعد في إيجاد سبيل مشترك للقضاء على الخلايا المقاومة للأشعة ولكن لا يعتبر التلوين المناعي كاف لتحديد CSCs بشكل واضح. كلمات مفتاحية: سرطان شائك الخلايا الفموي، واسمات الخلايا الجذعية السرطانية، المعالجة الشعاعية.

## Correlation of expression Cancer stem cell markers in oral squamous cell carcinoma in hamster through radiotherapy

Reham alsafadi<sup>1</sup>, Prof. Ahmad Almanadili<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PHD student at oral pathology department of faculty of dentistry Damascus university E-mail: [reham92.safadi@damascusuniversity.edu.sy](mailto:reham92.safadi@damascusuniversity.edu.sy)

<sup>2</sup> Professor at oral pathology department of faculty of dentistry- Damascus university

### Abstract:

**Background:** Oral squamous cell carcinoma is the most common tumor characterized by recurrence and invasion and there are many evidences have shown that recurrence and metastasis are associated with subgroup of cancer stem cells (CSCs) after treatment, this cells group responsible of migration and invasion. CSCs-markers are various, some of them in OSCC are CD44, ALDH1A1

**Aim of study:** Investigate the expression of CD44, ALDH1A1 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) after induced it in hamsters, then apply radiotherapy and compare them before and after treatment to verify the influence of these markers through radiotherapy and radiosensitivity

**Materials & methods:** It consisted 36 of hamesters (18 samples of OSCC which induced in the right cheek sinus of hamsters and 18 samples of OSCC which induced in the right cheek sinus of hamsters and were exposed to radiation therapy), Biopsies were taken and fixed with formalin, paraffin waxed in conventional H&E and immunostained with monoclonal anti- Aldehyde dehydrogenase 1 A1 and anti-cluster of differentiation 44.

**Results:** These markers showed positive expression in all samples and ranged from medium to high in oral squamous cell carcinoma before and after radiotherapy, there is a resistance in some of islands and neoplastic cells even after receiving 30 Gy

After immunostaining, we found a decrease in the number of samples that took high expression after treatment, but with non-statistically significant differences, on the other hand, we had a correlation between CD44 and ALDH1A1, moderately before treatment and high after treatment

**Conclusion:** resistance of tumor cells to radiotherapy may be due to the presence of this positive expression of CSCs markers, as they didn't give a high radiosensitivity and prevented DNA damage during treatment. Thus, it is important to find a supportive treatment using targeting these markers with radiotherapy to reach a better treatment.

This correlation between two markers may help to find a common pathway to eliminate radioresistant cells, but immunostaining is not sufficient to clearly identify CSCs.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, Aldehyde dehydrogenase 1 A1 (ALDH1A1), cluster of differentiation 44(CD44), cancer stem cells, radiotherapy.

Accepted:24/1/2022

Published:5/3/2023



**Copyright:** Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

**المقدمة :**

الممكن دمجها معاً (Cabrera-Rodríguez, 2016) (p:4). وإن فعالية العلاج الشعاعي تعتمد على إحداث تلف في الحمض النووي للخلايا المستهدفة، ويمكن أن يكون هذا الإجراء مباشراً أو من خلال التحلل الإشعاعي للماء وخلق الجذور الحرة غير المستقرة والتي تتفاعل بشكل ثانوي مع الدنا وخلال هذه التفاعلات، يتفاعل الأكسجين مع الجذور الحرة وقد يشكل مادة سامة (Mazeron et al., 2009) (P:3).

وأظهرت العديد من الأدلة أن النكس وتشكيل النقائل يرتبطان بوجود الخلايا الجذعية السرطانية (CSCs) وبقاتها بعد العلاج، وهي أهم مجموعة خلوية قادرة على الهجرة والغزو. كما تتميز هذه الخلايا بالتجدد الذاتي ومقاومة موت الخلايا المبرمج. لذلك تم اقتراح أن هذه الخلايا هي المسؤولة عن تطور الورم لتميز هذه الخلايا معدل أعلى للهجرة وإمكانية تشكيل النقائل مقارنة بخلايا الورم العادية الأخرى (Ortiz et al., 2018) (p:3). بالإضافة إلى أنها تلعب دوراً أساسياً في مقاومة الأورام للعلاجات التقليدية المتبعة (Patel et al., 2014) (p:1) وهناك حاجة إلى جهود كبيرة للتحديد الجزيئي للـ CSC ويمكن أن تساعد الواسمات الخاصة بها في التنبؤ عن هذه الخلايا وعن إنذار الورم (Rodrigues et al., Krause et al., 2017a) (p:1). حتى الآن، تم تمييز هذه الخلايا عن مجموعة الورم الأكبر من خلال النمط التعبيري عن بروتينات سطح الخلية (على سبيل المثال، CD24 و CD44، CD133) أو النشاط الخلوي، أو نشاط نزع هيدروجين الألدهيد ALDH1، وعادة ماتربط التعبيرية العالية لهذه الواسمات مع الإنذار السيء لسرطانات الرأس والعنق كما أظهرت بعض الدراسات أن هذه الواسمات يمكن تحفيزها عن طريق التعرض لعوامل مضادة للسرطان (Keysar and Jimeno, 2010) (p:4). أكثر واسمات CSC شيوياً هي CD44، وهو بروتين سكري غشائي ومستقبل للهيالورونان (HA)، مرتبط على نطاق واسع بالتصاق الخلايا وتكوين الأوعية وهجرة الخلايا وتكاثر الخلايا ضمن

يعتبر سرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق سادس أكثر أنواع السرطانات شيوعاً، ويظهر في الحفرة الفموية، البلعوم الأنفي والفموي، وعلى الرغم من تطور آليات جديدة لفهم عملية التسرطن لكن لم تتحسن معدلات البقاء survival rates لدى المرضى هذا السرطان خلال العقود الأخيرة (Leemans et al., 2011) (p:12). وإن التشخيص المتأخر، الاستجابة المنخفضة للعلاج، النكس المتكرر والانتشار الموضعي من أهل العوامل التي تشير إلى سوء الإنذار (Patel et al., 2014) (p:1).

لذلك ركزت العديد من الدراسات في الآونة الأخيرة على تحديد المؤشرات الحيوية biomarkers لهذا السرطان والتي يمكن أن تساعد في التنبؤ بالتشخيص واختيار الأسلوب العلاجي الأفضل لكل مريض (Rodrigues et al., 2018b) (p:1). ويتم عادة اختيار المعالجة المناسبة نسبةً لعوامل مختلفة مثل موقع السرطان ودرجته بالإضافة إلى الحالة الصحية العامة للمريض حيث تشمل طرائق العلاج في مراحله المبكرة خط واحد عن طريق العلاج الإشعاعي (RT) radiation therapy أو عن طريق الجراحة، بينما في المرحلة متقدمة من OSCC تكون الجراحة مع /أو العلاج الكيميائي الإشعاعي (CRT) chemoradiotherapy هو الخط الأول للعلاج. وإن علاج المرضى هذا السرطان في المراحل المبكرة (الأولى والثانية) يعتمد على الجراحة بشكل أساسي أو معالجة شعاعية وغالباً تعطي المرضى استجابة جيدة، مع معدل بقيا لمدة 5 سنوات وذلك لـ 90% من الحالات. ولكن هناك ما يقارب 10% من المرضى في المرحلة المبكرة من OSCC تعطي إنذار سيء حيث أظهرت وجود نقائل في العقد اللمفية العنقية ونقائل بعيدة (Khan et al., 2020) (p:4-10).

ويمكن استخدام العلاج الإشعاعي بتقنيتين، العلاج الإشعاعي الخارجي (External beam radiation therapy EBRT) العلاج الإشعاعي الخليلي (BTBrachytherapy) ومن

الأورام (p:1 Huang et al., 2014) ويتكون CD44 من 20 إكسون. له شكل أسوي قياسي CD44s (exons 6.20, 5.1) ، ويتم يعطي التضفير المتبادل باستخدام exons أشكال أسوية متعددة للبروتين تعرف بـ CD44v (p:2 Chen et al., 2018). تشير الدراسات في هذا المجال إلى تفاوت في أهمية CD44 في إيقاف نمو الورم وتطوره، وقد تُعزى هذه التناقضات بشكل كبير إلى الأشكال الأسوية المتعددة لهذا البروتين، حيث يتميز بالتضافر المتبادل للإكسونات المختلفة المختلفة لل CD44 فإدى ذلك لإنتاج أنماط عديدة، والتي يشار إليها بـ CD44v، وإن الشكل الإسوي مع عدم وجود إكسون متغير في mRNA هو CD44 النموذجي CD44s وهو أصغر الأشكال الإسوية والذي يتم التعبير عنه عموماً في الخلايا الفقارية، بينما يتم التعبير عن CD44v فقط في بعض الخلايا الخلايا الظهارية (Chen et al., 2014).

يُظهر ال CD44 تعبيرية في الأورام السرطانية وفي الظهارة الطبيعية، مما يجعل استخدامه بشكل مفرد كمؤشر على CSC قابل للشك حيث يتألف CD44 البشري من 18 إكسون وأشكال إسوية مختلفة منها (CD44v3, CD44v6, CD44v10) وهذا ما قد يفسر قدرة CD44 على الظهور في كل من الخلايا الطبيعية والخلايا الخبيثة ولكن بتعبيرات مختلفة (Rodrigues et al., 2018).

في العديد من الأورام الخبيثة ، ظهر ارتباط بين تعبيرية هذا الواسم مع الإنذار السيء ومعدل بقيا منخفض، ولكن تعبيرية CD44 كمسعر إنذاري للسرطان شائك الخلايا الفموي لا يزال غير واضح حيث يوجد الكثير من النتائج المتناقضة فيما يتعلق بقيمته مقارنة بإنذار الورم (p:3 Boxberg et al., 2018).

لذلك قد يكون CD44 لوحده ذو فائدة محدودة في دراسة آلية الخلايا الجذعية السرطانية في الفم ولكن بعض الواسمات الجزيئية الأخرى تم ظهور تعبيرية لها على الخلايا الشبيهة بالخلايا الجذعية في الفم مثل CD133 و ABCG2 و ALDH1

(Yu and Chang, 2013). ولذلك تتجه الدراسات الحديثة لدراسة أكثر من واسم حيوي لتحسين التعرف على CSC وتعتبر دراسة كل من CD44 و ALDH1 من أنجح الدراسات وهو جزء من عائلة الإنزيمات داخل الخلايا التي تشارك في تمايز الخلايا ومقاومة الأدوية، حيث إن الخلايا المعزولة من HSCC التي أظهرت تعبيرية إيجابية لكل من CD44 و ALDH1؛ أظهرت زيادة في التكاثر ومقاومة أكبر للعلاج الشعاعي ومعدل بقيا منخفض للمرضى المصابين للسرطان بشكل عام (Rodrigues et al., 2018a, Xu et al., 2020). وأكد بعض الباحثين أن وجود ALDH1 يعتبر مسؤول عن مقاومة العلاجات الكيميائية والشعاعية والنكس وتشكيل نقائل، ويظهر هذا الواسم بتعبيرية عالية في مراحل سرطان شائك الخلايا الفموي الأكثر عدوانية ونقائل عقديّة أعلى وتمايز أقل، وهذا يشير إلى مجموعة خلايا صغيرة تعطي تعبيرية إيجابية لـ ALDH1 في OSCC قادرة على تشكيل نقائل بعيدة عن الورم الأصلي (p:2 Soe et al., 2018). يساهم Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) في أكسدة حمض الريتينول أثناء التمايز المبكر للخلايا الجذعية ويرتبط أيضاً مع عدد الخلايا التي لها القدرة على الانتقال الظهاري الميزانشيمي epithelial-mesenchymal transition، وهي عملية تعتبر المفتاح الرئيسي لتشكيل ورم خبيث (Goossens-Beumer et al., 2014).

وتعتبر النماذج الحيوانية مهمة جداً لتحديد مسببات الأمراض البشرية المختلفة في ظل بيئة خاضعة للرقابة كما يعد استخدامها جزءاً من المراحل قبل السريرية أثناء اختبار الأدوية والعلاجات الجديدة قبل تجربتها على البشر. وفي حالات دراسة سرطان شائك الخلايا الفموي (OSCC) ، كانت النماذج الحيوانية مهمة أيضاً بتحديد مراحل تطور هذا الورم الخبيث ويفيد ذلك بفهم العوامل التي تدخل في عملية التسرطن والمؤشرات الحيوية، والتجارب الوقائية (Martínez B et al.,

وهو ضد وحيد النسيلة وتظهر التعبيرية الإيجابية في الهيولى باللون البني.

**طريقة العمل:** تم استحداث السرطان لدى الهامستر في المجموعتين بتطبيق المادة المسرطنة -7.12 dimethylbenze(a)anthracene (DMBA) بمعدل ثلاث

مرات في الأسبوع عن طريق دهن بواسطة فرشاة قياس 4 في عمق الجيب الخدي اليمين لمدة أربعة عشر أسبوعاً. ثم تم التضحية بالمجموعة الأولى واستئصال الجيب الخدي اليمين وبعد التأكد من حدوث الورم وظهور العلامات السريرية ومشاهدة العينات النسيجية للمجموعة الأولى وتأكد تشكل

السرطان. تم تعريض المجموعة الثانية للمعالجة الشعاعية في هيئة الطاقة الذرية وذلك باستخدام جهاز الكوبالت 60 وهو جهاز يستخدم للدراسات التجريبية يرسل حزم من الأشعة عالية الطاقة بشكل أفقي وتم تعريض الهامسترات لجرعة شعاعية كاملة وقدرها 30 Gy بشكل تراكمي حيث تم تقسيم الجرعة الشعاعية إلى 2 Gy لمدة 5 أيام بالأسبوع الواحد. وتمت

التضحية بـ 2 من الهامسترات بعد الأسبوع الأول ثم 2 من الهامسترات بعد الأسبوع الثاني ثم تم التضحية بباقي العينة بعد الانتهاء من التشيع بشكل كامل بعد 30 gy حيث قمنا بالتضحية بعد أسبوع من اكتمال الجرعة الشعاعية وذلك لإعطاء فترة زمنية لإظهار التأثيرات على الخلايا الورمية، حيث أكد john في كتابه أن الخلايا الورمية تبدأ بالموت الخلوي المبرمج بعد تطبيق الأشعة بعدة ساعات (john et al, 2003).

وذكر vilata وزملاؤه أن الحساسية الشعاعية تظهر بين 24 ساعة وأسبوع {Vilalta et al , 2016} وقمنا بعدها باستئصال الجيب الخدي اليمين وتحضير العينات لحضنها ضمن بلوكات شمعية ثم تم التلوين التقليدي بالهيماتوكسولين إيوزين

**التلوين المناعي:** بعد القطع بالمبشرة النسيجية يتم تسخين السلايدات في فرن 65° لمدة ساعة، ثم يتم الوضع في الإكزليلول والإيتانول ثم المحلول الدارئ. توضع السلات الحاوية

(P:5 2020). ويعتبر استخدام حيوان الهامستر أفضل وسيلة لدراسة OSCC حيث تمت دراسة التسرطن carcinogenesis في الجيب الخدي للهامستر وتشكيل السرطان بطلاء هذا الجيب بعوامل مسرطنة (P:6Vairaktaris et al., 2008) (Nikitakis et al., 2018)

إن تطبيق مادة dimethylbenz- [a] -anthracene 7,12 (DMBA) بشكل موضعي على الجيب الخدي للهامستر هو النموذج الأكثر تميزاً الذي تم تقديمه للتسرطن الفموي حيث يتشكل هذا السرطان ضمن الجيب خلال 12-14 أسبوعاً (P:12020 Amer et al., )

### الهدف من البحث:

تحري تعبيرية CD44، ALDH1A1 في سرطان شائك الخلايا الفموي OSCC بعد استحداثه عند الهامستر ثم تطبيق المعالجة الشعاعية ومقارنتها قبل وبعد المعالجة للتحقق من تأثير هذه الواسمات بالمعالجة الشعاعية ومدى الاستجابة الشعاعية في الخلايا الورمية.

### مواد البحث وطرائقه:

جرت الدراسة المخبرية على 36 حيوان هامستر تم حضنهم في حواضن الصيدلة- جامعة دمشق /كلية طب الأسنان- جامعة دمشق، وتم تقسيمهم إلى مجموعتين 18 هامسترًا للمجموعة الأولى و18 للمجموعة الثانية (2 بعد 10gy، 2 بعد 20 gy، 14 بعد 30gy)، تمت التضحية بهم وأخذ العينات النسيجية للدراسة في قسم النسيج والتشريح المرضي- طب الأسنان- جامعة دمشق، حيث تم تطبيق الجرعة الشعاعية للمجموعة الثانية في هيئة الطاقة الذرية- قسم الدراسات المخبرية

تم استخدام CD44 cluster of differentiation 44 من شركة biosb وهو ضد وحيد النسيلة وتظهر التعبيرية الإيجابية لهذا الواسم في الغشاء باللون البني. وتم استخدام Aldehyde dehydrogenase 1 A1 (ALDH1A1) من شركة biosb

الجدول(1): يبين مقدار التعبيرية والدرجات المعتمدة للخلايا الإيجابية الآخذة للون البني وشدة التلون في عينة البحث والقيمة الموافقة المعطاة لكل درجة.

القيمة الموافقة المعطاة	درجة التلون	درجة الخلايا الإيجابية الآخذة للون البني
0	لا يوجد تلوّن	أقل من أو يساوي 5%
1	تلون خفيف	أكثر من 5% وأقل من أو يساوي 25%
2	تلون متوسط الشدة	أكثر من 25% وأقل من أو يساوي 50%
3	تلون شديد	أكثر من 50% وأقل من أو يساوي 75%
4	-	أكثر من 75%

### النتائج:

بعد التلوّن التلقيدّي أظهرت لدينا العينات تشكّل سرطان شائك الخلايا الفموي من الدرجة الأولى حيث وجدنا جزر ورمية تحوي بعض مظاهر سوء التصنع البشري مع وجود لآليّ القرنين المتعددة، وبعد التلوّن المناعي توزعت التعبيرية الإيجابية للـ ALDH1A1 في هيولى الخلايا البشرية الورمية وخاصة في الخلايا الموجودة على محيط الجزر الورمية وكانت تعبيرية هذا الملون متوسطة قبل المعالجة في أغلب العينات حيث بلغ متوسط مقدار التعبيرية (نسبةً وشدةً) في المجموعة الأولى 7/4.16 وكان هناك انخفاض بشكل بسيط في التعبيرية بعد تقديم المعالجة الشعاعية 7/3.28 ولكن بشكل غير دال إحصائياً P=0.110 وذلك بعد إجراء اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم مقدار التعبيرية. بينما أظهرت العينات للواسم CD44 تعبيرية إيجابية في أغشية الخلايا البشرية الورمية وتراوحت بين المرتفعة نسبياً والمتوسطة قبل المعالجة في أغلب العينات حيث بلغ متوسط مقدار التعبيرية (نسبةً وشدةً) في المجموعة الأولى 7/5.11 وكان هناك انخفاض في التعبيرية بعد تقديم المعالجة الشعاعية 7/4.28 30Gy ولكن أيضاً بشكل غير دال إحصائياً P=0.342 وذلك بعد إجراء اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم مقدار التعبيرية.

على السلايدات والمحلول المظهر للمستضد في المايكرويف بدرجة حرارة 125 ثم 90. تترك السلايدات لتبرد بدرجة حرارة الغرفة. تزال السلايدات وتغسل بالمحلول الدارئ. توضع السلايدات في البيروكسيداز لمدة 5 دقائق. تغسل السلايدات بالمحلول الدارئ 3 مرّات ثم يتم وضع الضد الأولي (Primary Antibody) لمدة 45 د، حيث تم استخدام كلا الأضداد بشكل ممدد CD44-ALDH1A1 من شركة Bio SB حيث تكون جاهزة للاستخدام الفوري. ثم تغسل 3 مرّات بالمحلول الدارئ، يغطى النسيج بـ HRP لمدة 45 د، والغسل بالمحلول الدارئ، ثم يُحضّر الـ chromogen ويُطبّق على النسيج 10 د وتغسل السلايدات بالماء المقطّر 5 مرات، بعدها تلوّن السلايدات بالهياتوكسيلين-إيوزين.

طريقة دراسة الشرائح النسيجية : تمت دراسة تعبيرية هذين الواسمين في الخلايا البشرية باستخدام نظام IRS الذي يعتمد على حساب النسبة المئوية للخلايا المتلونة وشدة تلوّن هذه الخلايا ثم يتم جمعهم (Rodrigues et al., 2018b) فتدرجت النتائج بين (7-0) درجات ويتم حساب النسبة المئوية للخلايا الإيجابية عن طريق عد الخلايا التي تأخذ تلوّن بني في الغشاء للـ CD44 وفي السيتوبلازما (الهيولى) للـ ALDH1A1 في أربع ساحات مختلفة من كل شريحة ومن ثم حساب النسبة المئوية للخلايا المتلونة في الساحة من المجموع الكلي للخلايا في الساحة النسيجية وتم تقسيم العينات إلى أربع درجات كما هو وتم تقسيم شدة التلوّن أيضاً إلى 3 درجات كما هو موضح في الجدول 1.

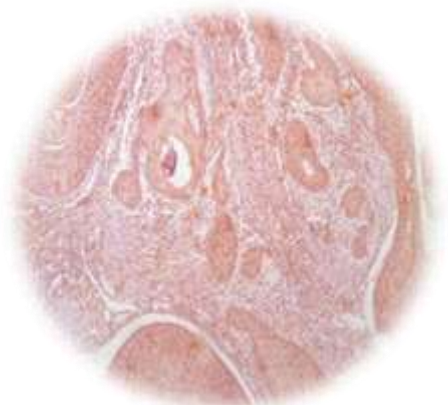
الطرائق الإحصائية: تم استخدام برنامج SPSS v.19 لتحليل البيانات التي حصلنا عليها إحصائياً، كما استعنا ببرنامج (MS Excel 2010) لإنجاز الرسوم البيانية



الشكل (3): تظهر تعبيرية إيجابية مرتفعة نسبياً للALDH1A1 في الخلايا الورمية (المجموعة الأولى). تكبير 400



الشكل (1): تظهر سحب الجيب الخدي اليمين للهامستر قبيل استئصاله

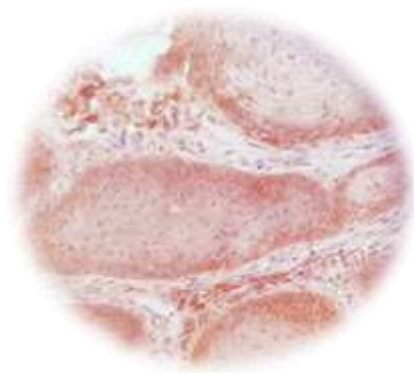


الشكل (4): تظهر تعبيرية إيجابية متوسطة للALDH1A1 (المجموعة الأولى). تكبير 100

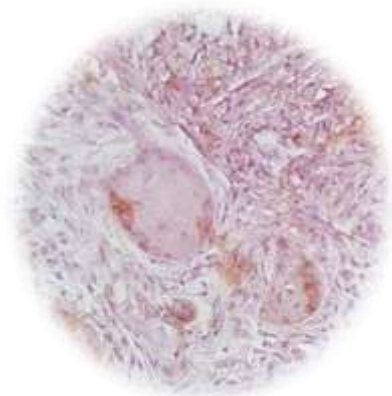


الشكل (2): توضح طريقة تطبيق الأشعة في جهاز الكوبالت 60 حيث تخرج حزم الأشعة عالية الطاقة بشكل أفقي

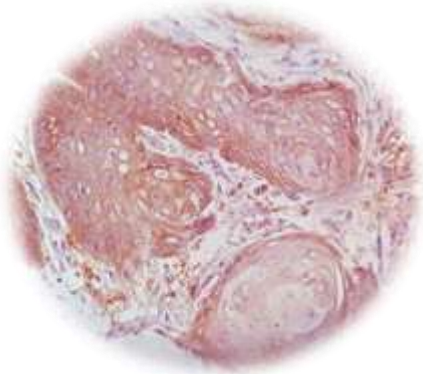




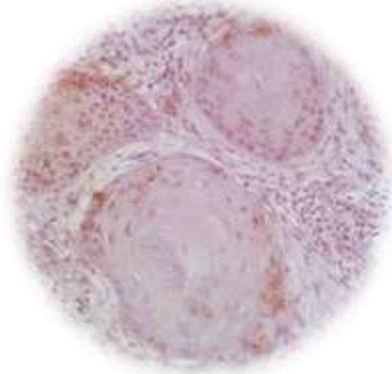
الشكل (7): تظهر تعبيرية متوسطة للCD44 ونشاهد ازدياد التعبيرية في الخلايا المحيطة للجزر الورمية (المجموعة الأولى).  
تكبير 400



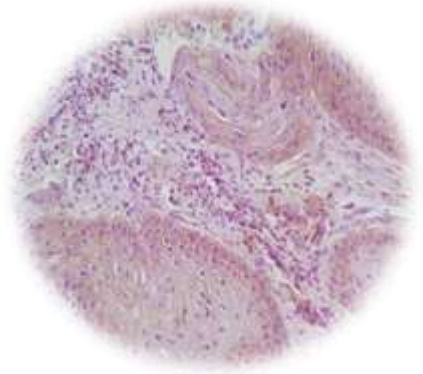
الشكل (5): تظهر تعبيرية إيجابية منخفضة للALDH1A1 بعد المعالجة الشعاعية. تكبير 400



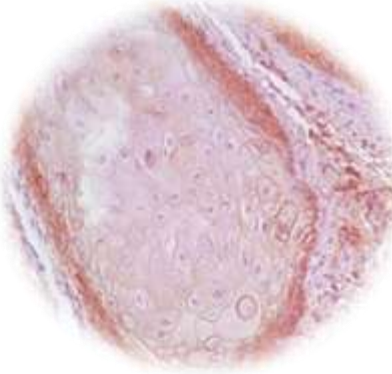
الشكل (8): تظهر تعبيرية إيجابية للCD44 في هولى الخلايا الورمية (المجموعة الثانية). تكبير 400



الشكل (6): تظهر تعبيرية إيجابية متوسطة الشدة والنسبة للALDH1A1 (المجموعة الثانية). تكبير 400



الشكل (10): تظهر تعبيرية إيجابية منخفضة في الشدة ومتوسطة في نسبة الخلايا الإيجابية للCD44 للخلايا الورمية (المجموعة الثانية). تكبير 400



الشكل (9): تظهر تعبيرية إيجابية منخفضة نسبة الخلايا الإيجابية ومتوسطة الشدة للCD44 في الخلايا الورمية (المجموعة الثانية). تكبير 400

الجدول (2): يبين مقدار تعبيرية الواسمين في المجموعة الأولى

رقم العينات في المجموعة الأولى	مقدار التعبيرية لل CD44 (شدة ونسبة)	مقدار التعبيرية لل ALDH1A1 (شدة ونسبة)
1	6	5
2	5	1
3	7	6
4	1	4
5	5	4
6	6	4
7	7	6
8	4	5
9	3	3
10	6	5
11	5	3
12	3	4
13	6	4
14	4	3
15	6	5
16	6	6
17	7	5
18	5	3

الجدول (3): يبين مقدار تعبيرية الواسمين في المجموعة الثانية

رقم العينات في المجموعة الثانية	الجرعات الشعاعية المعطاة	مقدار التعبيرية لل CD44 (شدة ونسبة)	مقدار التعبيرية لل ALDH1A1 (شدة ونسبة)
1	بعد 10 gy	5	4
2		7	6
3	بعد 20 gy	6	5
4		5	6
5	بعد 30 gy	4	2
6		5	4
7		5	4
8		6	5
9		2	1
10		2	1
11		4	3
12		6	4
13		4	3
14		4	4
15		5	5
16		4	3
17		4	2
18		4	4

الجدول (4): نتائج اختبار one way ANOVA للALDH1A1

لمتغير المدروس = مقدار تعبيرية واسم الخلايا الجذعية السرطانية ALDH1A1								
دلالة الفروق	قيمة مستوى الدلالة	قيمة f المحسوبة	الحد الأعلى	الحد الأدنى	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	عدد الخزعات النسيجية	درجة معالجة السرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث
لا توجد فروق دالة	0.110	2.191	6	1	1.42	4.16	18	سرطان شائك الخلايا مستحدث دون معالجة
			6	4	1.41	5.00	2	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 10 غراي
			6	5	0.71	5.50	2	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 20 غراي
			5	1	1.32	3.28	14	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 30 غراي

الجدول (5): نتائج اختبار one way ANOVA للCD44

المتغير المدروس = مقدار تعبيرية واسم الخلايا الجذعية السرطانية CD44								
دلالة الفروق	قيمة مستوى الدلالة	قيمة f المحسوبة	الحد الأعلى	الحد الأدنى	الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	عدد الخزعات النسيجية	درجة معالجة السرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث
لا توجد فروق دالة	0.342	1.161	7	1	1.60	5.11	18	سرطان شائك الخلايا مستحدث دون معالجة
			7	5	1.41	6.00	2	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 10 غراي
			6	5	0.71	5.50	2	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 20 غراي
			6	2	1.20	4.28	14	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 30 غراي

الجدول (6): نتائج اختبار معامل بيرسون يوضح وجود علاقة طردية وارتباط بين هذين الواسمين قبل وبعد المعالجة

شدة العلاقة	جهة العلاقة	دلالة وجود العلاقة	المتغير الأول = قيم مقدار تعبيرية واسم الخلايا الجذعية السرطانية ALDH1A1			درجة معالجة السرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث	المتغير الثاني
			قيمة معامل الارتباط	عدد الخزعات النسيجية	قيمة مستوى الدلالة		
متوسطة	طردية	توجد علاقة بالية	0.506	18	0.032	سرطان شائك الخلايا مستحدث دون معالجة	قيم مقدار تعبيرية واسم الخلايا الجذعية السرطانية CD44
قوية	طردية	توجد علاقة دالة	0.860	14	0.000	سرطان شائك الخلايا مستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 30 غراي	

الذي قد يصل إلى الفك العلوي والسفلي (Subarnbhesaj and Miyachi, 2017)، إن الخلايا الجذعية السرطانية ضرورية لبدء الورم، تكراره وانتشاره لذلك تم اقتراح تحديدهم كاستراتيجية علاجية هادفة ضد السرطان. يمكن استخدام تحديد وقياس الخلايا الجذعية السرطانية لتطوير الأدوية المستهدفة المضادة للسرطان. من خلال استهداف هذه الخلايا بالتحديد حيث يمكن تخفيف الآثار الجانبية الهامة المحتملة الناجمة عن تثبيط وظيفة الخلايا الجذعية الطبيعية (Dhumal et al., 2021).

عندما يتجاوز تلف الحمض النووي في العلاج الإشعاعي قدرة إصلاح الخلية، فإن بروتينات إشارات DDR تتوسط موت الخلايا أو فقدان قدرة على التكاثر من خلال تنشيط مسارات مختلفة مثل موت الخلايا المبرمج أو شيخوخة الخلايا. لذلك فإن فعالية آلية إصلاح الحمض النووي التي تنشطها شبكة إشارات تلف الحمض النووي أمر بالغ الأهمية فهو يحدد موت الخلية أو إصلاحها. تم وصف قدرة عالية على إصلاح الحمض النووي لمجموعات CSC في أنواع مختلفة من الأورام بما في ذلك الورم الأرومي الدبقي وسرطان البروستات والرئة والثدي ويعزى ذلك أساساً إلى تنشيط مسارات إشارات-ATR و Chk2 و ATM-Chk1 (Krause et al., 2017b).

دراسة العلاقة بين مقدار ALDH1A1 و CD44 في عينة البحث:

تم حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين هذين الواسمين، ووجدنا علاقة ارتباط ذات دلالة إحصائية بين قيم هذين الواسمين في كل من مجموعة السرطان شائك الخلايا المستحدث دون معالجة ومجموعة السرطان شائك الخلايا المستحدث مع معالجة شعاعية بمقدار 30 Gy، وبما أن الإشارة الجبرية لمعاملي الارتباط الموافقين كانت موجبة نستنتج أن كلاً من العلاقتين الموافقتين طردية، حيث كانت طردية متوسطة قبل المعالجة وعلاقة طردية قوية بعد المعالجة الشعاعية 30gy.

### المناقشة:

يشكل سرطان شائك الخلايا أكثر من 90% من سرطانات الرأس والعنق ويحدث بشكل رئيسي في الحفرة الفموية والبلعوم، إن عوامل الخطر الأكثر شيوعاً المرتبطة بـ HNC هي منتجات التبغ والكحول (Attar 1 et al., 2010) ويتميز معظم سلوكيات الأورام الخبيثة ومنهم OSCC في استعمار العقد اللمفية وتشكيل نقائل إلى أماكن بعيدة عن الورم الأصلي إضافة إلى النكس المتكرر للورم بعد المعالجة والغزو الورمي

اقتربت دراستنا مع دراسة LEINUNG (Leinung et al., 2015) وزملاؤه الذي درس هذين الواسمين أيضاً في HNSCC ووجد علاقة ارتباط جزئي بينهما كما تماثل متوسط نسبة تعبيرية الخلايا المتوسطة لل ALDH1A1 الذي كان ٥٤ % في OSCC ولكن أعطت نتائج تعبيرية عالية لل CD44 وهذا يشابه إلى حد ما نتائج دراستنا كما أكد على عدم إمكانية الاعتماد على هذه الواسمات بمفردهما أو معا لتحديد الخلايا الجذعية السرطانية وإنما دراسة آلية سير هذه البروتينات بشكل عام وقد توافقنا معه في ذلك أيضاً ضمن حدود دراستنا، ومن جهة أخرى، اختلفنا معه في موقع الخلايا الآخذة للتعبيرية الإيجابية لل ALDH1A1 حيث وجد ان معظم الخلايا الإيجابية في مركز الجزر الورمية وقد فسر ذلك لارتباط هذا البروتين بنقص الأكسجة فتكون الخلايا المركزية الأقل حظاً من الأكسجين وقد يعود هذا الاختلاف لعدم تشابه حجم العينة بينما اتفقنا معه بتعبيرية CD44 في الخلايا المحيطة للجزر وهذا ماثبت دور هذا البروتين في الغزو. كما أن استخدام الهامسترات مفيد من أجل استحداث السرطان ضمن الجيب الخدي المعزول ولكن من جهة أخرى عند تعريضه للجرعات الإشعاعية لم نستطع عزل المنطقة المراد تشيعها فقط، ونظراً لصغر حجمه ووزنه لم نستطع تعريض الهامستر لجرعات إشعاعية أعلى ونظراً لإثبات العديد من الدراسات في سرطانات مختلفة عن مقاومة هذا الواسم للعلاج الإشعاعي حتى عند جرعات أعلى فمن المتوقع استمرارية ظهور تعبيرية لهذه الواسم في الخلايا الورمية المقاومة للعلاج الإشعاعي.

**مناقشة قيمة تعبيرية CD44 و ALDH1A1 في سرطان شائك الخلايا المستحدث عند الهامستر قبل وبعد المعالجة الشعاعية RT.**

تقاربت نتائج دراستنا مع Dhumal (Dhumal et al., 2021) وزملاؤه الذي درس هذا الواسم في كل من البشرة الطبيعية وسوء التصنع البشري وسرطان شائك الخلايا الفموي ووجد أعلى تعبيرية في OSCC وخاصة في جيد التمايز وهذا مشابه لما وجدناه ضمن دراستنا حيث أخذت غالبية العينات تعبيرية مرتفعة إلى متوسطة في عينات سرطان شائك الخلايا الفموي من الدرجة الأولى. كما أظهرت نتائج الدراسة عدم وجود حساسية أو استجابة شعاعية للعديد من الجزر والخلايا الورمية بعد تقديم معالجة ب Gy30 وعند تحري تعبيرية CD44 بعد المعالجة وجدنا تعبيرية إيجابية أيضاً في بعض هذه الخلايا الورمية المقاومة للعلاج الشعاعي، وكان هناك القليل من الدراسات التي درست هذا الواسم بعد تقديم المعالجة الشعاعية ولكن تشابهت دراستنا مع دراسة Jong الذي درس CD44 في سرطان الحنجرة بعد RT وشاهد ارتباط هذا الواسم مع الاستجابة للعلاج الإشعاعي للسرطان في مراحله المبكرة أيضاً، كما تنبأ أن الحالات التي أظهرت تعبيرية عالية لهذا الواسم قد تعطي إندارية أكبر بالنكس وأكد على ضرورة قيام مزيد من الدراسات لتأكيد ذلك وتقييم مدى عمومية هذه النتائج في مواقع مختلفة من أورام الرأس والعنق (Jong et al., 2010).

لم نجد دراسة مماثلة لدراستنا في التحري عن تعبيرية ALDH1A1 في OSCC بعد المعالجة الشعاعية ولكن هناك تشابه مع دراسة Yao (Yao et al., 2020) الذي أثبت أن الخلايا المقاومة للإشعاع تكون ناقصة التأكسج وتعتبر أيضاً عن ALDH1A1 في سرطان عنق الرحم وهذا ما قد يشير إلى أهمية دور هذا الواسم في المقاومة الإشعاعية ووجوب التركيز على القضاء على هذه الخلايا بسبل أخرى .

### الاستنتاجات:

الخلايا المقاومة للأشعة ولكن لايعتبر التلويين المناعي كاف لتحديد CSCs بشكل واضح.

نستنتج في ضوء هذا البحث أن هناك خلايا تعبر عن CD44 وALDH1A1 لا تبدي استجابة للعلاج الإشعاعي بحزم عالية الطاقة بأشعة غاما الصادرة من جهاز الكوبالت 60 بشكل كامل وذلك حتى بعد جرعة تراكمية قدرها 30 Gy، وهذا يؤكد على مقاومة الخلايا الموسومة بهذا الواسمات للأشعة حيث قامت بمنع تلف DNA الخلايا المستهدفة أثناء العلاج وبهذا يكمن أهمية إيجاد علاج داعم يستهدف هذه الواسمات مع المعالجة الشعاعية للوصول إلى معالجة أفضل، وإن ارتباط هذين الواسمين قد يساعد في إيجاد سبيل مشترك للقضاء على

### المقترحات :

نقترح إجراء دراسة مماثلة على عدد أكبر من واسمات CSCs ومقارنة ارتباطهما لإمكانية تحديد السبيل الأدق لاستهدافه في المعالجة، ودراسة هذه الواسمات على درجات مختلفة من السرطان للتأكد من قيمتها الإنذارية كما نقترح استخدام جهاز التدفق الخلوي ومقارنته نتائجه مع نتائج التلويين المناعي.

### References:

1. AMER, M. H., HASSAN, M. M. A., ATTIA, F. M., ABOU EL-NOUR, K. M. & KORRAAH, A. M. M. E. 2020. XRCC1 immunohistochemical expression in DMBA – induced oral squamous cell carcinoma treated with different thymoquinone preparations. *Dental Science Updates*, 1, 151-159.
2. ATTAR, E., DEY, S., HABLAS, A., SEIFELDIN, I. A., RAMADAN, M., ROZEK, L. S. & SOLIMAN, A. S. 2010. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral Oncol*, 46, 591-6.
3. BOXBERG, M., GOTZ, C., HAIDARI, S., DORFNER, C., JESINGHAUS, M., DRECOLL, E., BOSKOV, M., WOLFF, K. D., WEICHERT, W., HALLER, B. & KOLK, A. 2018. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. *Histopathology*, 73, 559-572.
4. CABRERA-RODRÍGUEZ, J. J. 2016. The role of radiotherapy in the treatment of oral cavity cancer. *parjournal*.
5. CHEN, C., ZHAO, S., KARNAD, A. & FREEMAN, J. W. 2018. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, 11, 64.
6. DE JONG, M. C., PRAMANA, J., VAN DER WAL, J. E., LACKO, M., PEUTZ-KOOTSTRA, C. J., DE JONG, J. M., TAKES, R. P., KAANDERS, J. H., VAN DER LAAN, B. F., WACHTERS, J., JANSEN, J. C., RASCH, C. R., VAN VELTHUYSEN, M.-L. F., GRÉNMAN, R., HOEBERS, F. J., SCHUURING, E., VAN DEN BREKEL, M. W. & BEGG, A. C. 2010. CD44 Expression Predicts Local Recurrence after Radiotherapy in Larynx Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16, 5329-5338.
7. DHUMAL, S. N., CHOUDHARI, S. K., PATANKAR, S., GHULE, S. S., JADHAV, Y. B. & MASNE, S. 2021. Cancer Stem Cell Markers, CD44 and ALDH1, for Assessment of Cancer Risk in OPMDs and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol*.
8. GOOSSENS-BEUMER, I. J., ZEESTRATEN, E. C. M., BENARD, A., CHRISTEN, T., REIMERS, M. S., KEIJZER, R., SIER, C. F. M., LIEFERS, G. J., MORREAU, H., PUTTER, H., VAHRMEIJER, A. L., VAN DE VELDE, C. J. H. & KUPPEN, P. J. K. 2014. Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 110, 2935-2944.
9. HUANG, C. F., XU, X. R., WU, T. F., SUN, Z. J. & ZHANG, W. F. 2014. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med*, 43, 492-8.
10. JB. Principal Cellular and Tissue Effects of Radiation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003
11. KEYSAR, S. B. & JIMENO, A. 2010. More than Markers: Biological Significance of Cancer Stem Cell-Defining Molecules. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 2450-2457.
12. KRAUSE, M., DUBROVSKA, A., LINGE, A. & BAUMANN, M. 2017a. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv Drug Deliv Rev*, 109, 63-73.
13. KHAN, T., RELITTI, N., BRINDISI, M., MAGNANO, S., ZISTERER, D., GEMMA, S., BUTINI, S. & CAMPANI, G. 2020. Autophagy modulators for the treatment of oral and esophageal squamous cell carcinomas. *Med Res Rev*, 40, 1002-1060.
14. LEINUNG, M., ERNST, B., DORING, C., WAGENBLAST, J., TAHTALI, A., DIENSTHUBER, M., STOVER, T. & GEISLER, C. 2015. Expression of ALDH1A1 and CD44 in primary head and neck squamous cell carcinoma and their value for carcinogenesis, tumor progression and cancer stem cell identification. *Oncol Lett*, 10, 2289-2294.

15. MARCU, L. G., DASU, I. T. & DASU, A. 2015. The Six Rs of Head and Neck Cancer Radiotherapy. *Contemporary Issues in Head and Neck Cancer Management*.
16. MARTÍNEZ B, D. A., BARATO GÓMEZ, P. A., IREGUI CASTRO, C. A. & ROSAS PÉREZ, J. E. 2020. DMBA-Induced Oral Carcinoma in Syrian Hamster: Increased Carcinogenic Effect by Dexamethasone Coexposition. *BioMed Research International*, 2020, 1470868.
17. MAZERON, R., AZRIA, D. & DEUTSCH, E. 2009. [Angiogenesis inhibitors and radiation therapy: from biology to clinical practice]. *Cancer Radiother*, 13, 568-73.
18. NIKITAKIS, N. G., PENTENERO, M., GEORGAKI, M., POH, C. F., PETERSON, D. E., EDWARDS, P., LINGEN, M. & SAUK, J. J. 2018. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125, 650-669.
19. ORTIZ, R. C., LOPES, N. M., AMÔR, N. G., PONCE, J. B., SCHMERLING, C. K., LARA, V. S., MOYSES, R. A. & RODINI, C. O. 2018. CD44 and ALDH1 immunexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 47, 740-747.
20. PATEL, S. S., SHAH, K. A., SHAH, M. J., KOTHARI, K. C. & RAWAL, R. M. 2014. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 8549-56.
21. RODRIGUES, M., XAVIER, F. C. A., ANDRADE, N. P., LOPES, C. & MIGUITA LUIZ, L. 2018a. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. 40, 1759-1773.
22. RODRIGUES, M., XAVIER, F. C. A., ANDRADE, N. P., LOPES, C., MIGUITA LUIZ, L., SEDASSARI, B. T., IBARRA, A. M. C., LOPEZ, R. V. M., KLIEMANN SCHMERLING, C., MOYSES, R. A., TAJARA DA SILVA, E. E. & NUNES, F. D. 2018b. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 40, 1759-1773.
23. SOE, K., HTWE, M. & THEIN, Z. Immunohistochemical Expression of CD44 and ALDH1 in Oral Submucous Fibrosis and Oral Squamous Cell Carcinoma. 2018.
24. SUBARNBHESAJ, A. & MIYAUCHI, M. 2017. Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. 12, e0187092.
25. TAMATANI, T., TAKAMARU, N., OHE, G., AKITA, K., NAKAGAWA, T. & MIYAMOTO, Y. 2018. Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and II oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. *Oncol Lett*, 16, 1133-1140.
26. VILALTA, M., RAFAT, M. & GRAVES, E. E. 2016. Effects of radiation on metastasis and tumor cell migration. *Cell Mol Life Sci*, 73, 2999-3007.
27. VAIRAKTARIS, E., SPYRIDONIDOU, S., PAPAKOSTA, V., VYLLIOTIS, A., LAZARIS, A., PERREA, D., YAPIJAKIS, C. & PATSOIRIS, E. 2008. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncology*, 44, 315-324.
28. XU, H., NIU, M., YUAN, X., WU, K. & LIU, A. 2020. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. *Experimental Hematology & Oncology*, 9, 36.
29. YAO, T., WENG, X., YAO, Y., HUANG, C., LI, J., PENG, Y., LIN, R. & LIN, Z. 2020. ALDH-1-positive cells exhibited a radioresistant phenotype that was enhanced with hypoxia in cervical cancer. *BMC Cancer*, 20, 891.
30. YU, C. C. & CHANG, Y. C. 2013. Enhancement of cancer stem-like and epithelial-mesenchymal transdifferentiation property in oral epithelial cells with long-term nicotine exposure: reversal by targeting SNAIL. *Toxicol Appl Pharmacol*, 266, 459-69.