

دراسة تأثير الغلوكوز على تعبيرية البروتين HIF-1 α في تطور السرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث عند الهامستر

صفا زكريا¹، شريف بركات²

¹طالبة دكتوراه في قسم النسيج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان جامعة دمشق.
²أستاذ في قسم النسيج والتشريح المرضي بكلية طب الأسنان جامعة دمشق.

الملخص:

خلفية البحث: تحتل سرطانات الرأس والعنق المرتبة السادسة كأكثر السرطانات شيوعاً في العالم، كما ان حوالي 90% من سرطانات الرأس والعنق تصادف في التجويف الفموي، والخلايا السرطانية تتميز بطريقة استقلاب مختلفة عن الخلايا الطبيعية وإعادة برمجة الاستقلاب يتم التعرف عليه كأحد جوانب الاستجابة التكيفية للخلايا السرطانية لنقص الأكسجة.

الهدف من البحث: دراسة تأثير النظام الغذائي (الغني بالجلوكوز أو الخالي من سكر الغلوكوز) على مراحل التطور النسيجي لسرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث عند الهامستر، ودراسة تأثير النظام الغذائي على بيئة نقص الأكسجة الورمية من خلال دراسة تعبير (HIF-1 α).

مواد وطرائق البحث: تم حضن 40 من حيوانات التجربة وهي عبارة عن الهامستر السوري، وتم تقسيم الهامسترات إلى مجموعتين، المجموعة الأولى تألفت من 20 هامستر طبقت عليها المادة المسرطنة ضمن الجيب الخدي بمعدل ثلاث أيام في الأسبوع مع إتباع حمية غذائية غنية بسكر الغلوكوز، بينما المجموعة الثانية تألفت من 20 هامستر طبقت عليها المادة المسرطنة بمعدل ثلاث أيام في الأسبوع مع حمية غذائية خالية من سكر الغلوكوز تم إجراء الدراسة النسيجية المناعية بعد التلوين بالضد HIF-1 α على العينات المأخوذة من حيوانات التجربة.

النتائج: زادت نقص الأكسجة مع الحمية الحاوية على السكر الغلوكوز فكانت تعبيرية HIF-1 α في المجموعة الأولى 56.5% وفي المجموعة الثانية 43.8%.

الاستنتاجات: تطور السرطان شائك الخلايا الفموي بشكل أسرع مع الحمية الحاوية على سكر الغلوكوز، وتقليل السكريات تحد من تطور السرطان شائك الخلايا الفموي وتقلل من البيئة نقص الأكسجة.

الكلمات المفتاحية: السرطان البشري شائك الخلايا الفموي، الغلوكوز، عامل نقص الأكسجة (HIF-1 α)، الهامستر.

تاريخ القبول: 2022/5/12

تاريخ الإيداع: 2022/2/16

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

ISSN: 2789-7214 (online)

<http://journal.damascusuniversity.edu.sy>



Study of the effect of glucose on HIF-1 α protein expression in oral squamous cell carcinoma developed in hamsters.

Safa Zakaraia¹, Charif Barakat²

¹PHD student at oral pathology department of faculty of dentistry Damascus University

²professor at oral pathology department of faculty of dentistry –Damascus university.

Abstract:

Abstract: Head and neck cancer is the sixth most frequent cancer worldwide and over 90% of head and neck cancer occurs in the oral cavity, Cancer cells have a different metabolism method than normal cells, the metabolic reprogramming used to be recognized as one aspect of cancer cells adaptive response to hypoxia

Aim of study: Studying the effect of a diet (glucose-rich or free) on the stages of histological development of squamous cell carcinoma induced in hamsters, and studying the effect of the diet on the neoplastic hypoxia environment through a study of HIF-1 α expression.

Materials and Methods: 40 of the experiment's Syrian Hamsters were incubated in two groups: 1st one consisted of 20 hamsters on which the carcinogenic material was applied within the cheek pocket three days per week with a diet rich in sugars, while the 2nd one was 20 hamsters which the carcinogenic material was applied within the cheek pocket three days per week with a diet free in sugars. Immunohistochemically study was performed after staining with HIF-1 α antibody on samples taken from experimental animals.

Results: Hypoxia increased with the diet rich-glucose and HIF-1 α of the first group showed 56.6% and in the second group 43.3%.

Conclusion: Oral Squamous cell carcinoma develops faster with a diet rich-glucose, and reducing sugars limits Oral squamous cell carcinoma development and reduces the hypoxic environment.

Key words: Oral squamous cell carcinoma, Glucose, HIF-1 α : Hypoxia-inducible factors, Hamsters.



Submitted: 16/2/2022

Accepted: 12/5/2022

Copyright: Damascus University Syria.

The authors retain copyright under CC BY-NC-SA

المقدمة:

الخلايا الطبيعية بتحلل اللاهوائي للجلوكوز وتنتج فقط جزيئين من ATP من كل جزيء جلوكوز مع حمض اللاكتيك lactic acid كمنتج ثانوي. أما الخلايا السرطانية تقوم بعملية تحلل الجلوكوز Glycolysis حتى بوجود الاوكسجين وليس بالفسفرة التأكسدية للميتوكوندريا وهذا التكيف عالي التنظيم ومفيد للخلايا السرطانية، وبسبب التحول من الفسفرة التأكسدية إلى التحلل الجلوكوز ينتج حموض اللاكتات ويسمح بتأمين بيئة مناسبة لنمو سريع للخلايا السرطانية (Semenza, 2010, 625). في هذه الحالة زيادة حمض اللبنيك Lactic acid يزيد من درجة حموضة الوسط الخارج الخلوي حول الورم، وهذه الظروف تدعم تكاثر الخلايا السرطانية ومطالب الطاقة والاستعمار وتشكل الأوعية الدموية وتنشيط الاستجابة المناعية (Gatenby et al., 2006, 5223).

على عكس الخلايا السليمة التي تقوم بإحراق جزيء الجلوكوز بأكمله لإنتاج كمية كبيرة من الطاقة، الخلايا السرطانية مبذرة وتقوم بتحطيم لجزيئات الجلوكوز بشكل جزئي، حيث تفرط بالخطوة الأولى من عملية التنفس الخلوي وهي تحلل السكر glycolysis، ولا تكمل الخطوات التالية من عملية التنفس الخلوي (معالجة البيروفات - دورة كريبس - الفسفرة التأكسدية)، نتيجة لذلك تنتج فقط جزيئين من ATP لكل جزيء من الجلوكوز بدلاً من 38، فالخلايا السرطانية تحتاج إلى كمية أكبر من جزيئات الجلوكوز لإنتاج كمية كافية من الطاقة للبقاء على قيد الحياة (Kroemer and Pouyssegur, 2008, 474).

أوتو واربروغ Otto Warburg العالم الألماني الكيميائي الفيزيولوجي هو أول من وصف هذا السلوك الغير العادي للخلايا السرطانية، حيث لاحظ أن الخلايا السرطانية فقط تكمل بعملية glycolysis وليس بالفسفرة التأكسدية Ox-phos حتى مع وجود الاوكسجين وهذه العملية تدعى بتحلل السكر الهوائي (aerobic glycolysis) مع ان وجود الأوكسجين يجب ان

الأبيض (الاستقلاب): يصف هذا المصطلح سلسلة من التفاعلات الكيميائية التي تحدث ضمن الخلايا تهدف إلى توفير المواد والطاقة اللازمة للأنظمة البيولوجية للحفاظ على وظائفها، وذلك من خلال تفكيك مواد الطعام وتحويلها إلى طاقة، تتغير عملية الأيض داخل الجسم نتيجة لمرض معين ويعد فهم عملية الأيض عامل أساسي في علاج العديد من الامراض (Evans and Heather, 2019, 302). العملية الرئيسية لإنتاج الـ ATP في الخلايا الطبيعية هي استقلاب الكربوهيدرات داخل الخلايا وتفكيكها إلى جلوكوز، ويتم ذلك عن طريق التنفس الخلوي (Cellular respiration) وهو مسار استقلابي متكامل وسلسلة من الخطوات التي تستخدمها الخلايا لتحطيم السكر وإعطاء الطاقة التي تحتاجها الخلايا لإجراء وظائفها، تم تقسيمه إلى 4 عمليات مترابطة معاً التي تحول الطاقة الكيميائية في الجلوكوز إلى طاقة كيميائية في الـ ATP وهذه العمليات الأربعة هي: (عملية تحلل السكر Glycolysis، عملية معالجة البيروفات، دورة حمض الستريك citric acid cycle، الفسفرة التأكسدية) (Reece et al., 2011, 163).

أما الخلية السرطانية تعيش في بيئة مختلفة عن الخلايا الطبيعية ولها متطلبات غذائية مختلفة عن الخلايا الطبيعية، تنقسم الخلية السرطانية بشكل سريع وتنمو عادةً في بيئة حامضية ناقصة الأوكسجين، كما ان الخلايا السرطانية قادرة على انتقاء المواد المغذية بشكل انتقائي من مجرى الدم من اجل تحقيق استقلاب متوازن لها وتفضل الجلوكوز الذي ينتج عن استقلابه الحموض وبالتالي بيئة مناسبة لنمو الخلايا السرطانية، في الحالة الطبيعية تقوم الخلايا بإنتاج ATP بوجود الاوكسجين الكافي بواسطة الفسفرة التأكسدية للميتوكوندريا (OXPHOS) وتولد 38 جزيء ATP من كل جزيء جلوكوز، لكن في حالة عدم وجود كمية كافية من الأوكسجين تقوم

التحفيزي لـ Myc على تكوين الحيوي للميتوكوندريا، وبالتالي تقليل كتلة الميتوكوندريا وبالمقابل، يتعاون HIF-1 مع c-Myc لتعزيز التحلل الهوائي عن طريق تحريض HK2 و PDK1 (Yeh *et al.*, 2017, 7661). و HIF هي عوامل النسخ transcription التي تستجيب في حالة انخفاض الاوكسجين في البيئة الخلوية، ويلعب HIF-1 دوراً أساسياً في الاستجابات الخلوية والجهازية لنقص الأوكسجين، يتكون المركب HIF من وحدتين فرعيتين HIF-1 α و HIF-1 β وهما بروتينات محلزته اساسية من عائلة PAS، HIF1 α هو بروتين يرمز عند الانسان بواسطة جين HIF1A gene. يعتبر HIF1 α المنظم الرئيسي للاستجابة الخلوية للضغوط نقص الاكسجة فهو ينظم عملية نسخ العديد من الجينات التي تسهل الاستجابة لبيئة نقص الأوكسجين وتشارك في المسارات المختلفة مثل امتصاص واستقلاب الجلوكوز-تعزيز تولد الأوعية الدموية - تكاثر الخلايا والموت الخلوي المبرمج وانتشار الورم. من بين أكثر المسارات تأثراً ومن المتوقع انها تستجيب لنقص الأكسجة هي زيادة التحلل الجلوكوز (Vaupel and Mayer, 2007, 225). فالخلايا عندما تخضع لنقص الاكسجة فإنها تحفز أنزيمات التحلل السكري ويقوم HIF1 بتكليف مع هذا الاستقلاب من خلال زيادة تحول الجلوكوز إلى بيروفات و إنتاج طاقة ATP واعادة برمجة الاستقلاب من خلال تحول من الاستقلاب التأكسدي إلى التحلل الجلوكوز، فالاعتقاد الشائع ان بروتينات HIF تنظم استقلاب الجلوكوز بشكل مركزي ومسؤولة عن آثار واربورغ، يعتبر تحلل الجلوكوز أقل كفاءة من الفسفرة التأكسدية، مع عائد قدره 2من جزئيات ATP وللتعويض عن انخفاض الكفاءة، ينشط HIF-1 α التعبير عن ناقلات الجلوكوز GLUT1 و GLUT3 ، على التوالي، لزيادة تسليم الركيزة لتحلل الجلوكوز (Zhou *et al.*, 2018, 308). وسكر الجلوكوز وهو سكر العنب، صيغته الكيميائية: C₆H₁₂O₆، الجلوكوز غالباً ما يدخل الجسم عن طريق الكربوهيدرات المختلفة، يخزن

يسمح لهم باستكمال عملية التنفس، لكن الخلايا السرطانية تعتمد على تحلل السكر (glycolysis) كمصدر وحيد لإنتاج الطاقة، حتى مع وجود الاوكسجين ويطلق عليه اسم تأثير واربورغ Warburg effect (Warburg, 1956, 309)، (El Mjiyad *et al.*, 2011, 258). وصفت العديد من الدراسات السابقة العديد من المركبات التي تتوسط خصائص تأثير واربورغ بما في ذلك، 1-زيادة التعبير عن ناقلات الجلوكوز وبالتالي زيادة امتصاص الجلوكوز 2-زيادة إنتاج NADH المحفز بمسار فوسفات البننوز 3-تغير من نشاط الإنزيمات المرتبطة بتحلل السكر مثل عامل نقص الأكسجة HIF وتنشيط الناجم عن MYC 4-زيادة إنتاج اللاكتات. يمكن استهداف هذه الخصائص لتطوير علاجات للسرطان (Tran *et al.*, 2020). يُنظم تأثير واربورغ من خلال عدة طرق اشارة أهمها: PI3K/Akt pathway، عامل نقص التأكسج (HIF)، P53، MYC، و (AMPK) (Cairns *et al.*, 2011, 90). AKT هو احد جينات الورمية oncogene التي تشارك في استقلاب الخلايا الورمية ويقائها على قيد الحياة. ويمكن ان تنتشط استجابةً لنقص الأكسجة وتفعيل HIF-1 α والتي يمكن ان تؤدي إلى زيادة بقاء الخلايا السرطانية (Kaelin Jr and Thompson, 2010, 562). والجينات الورمية الأخرى مثل RAS و MYC غالباً ما تنتشط في الخلايا السرطانية، والبروتينات الخاصة بتلك الجينات تساهم في عملية تحلل السكر الهوائي في الخلايا السرطانية aerobic glycolysis (Mammucari *et al.*, 2017, 139). يحفز HIF-1 تحويل الجلوكوز إلى لاكتات وبيروفات عن طريق تنظيم ناقل الجلوكوز Glut1، و hexokinase (انزيم HK1، HK2) اللذان يحفزان الخطوة الأولية لعملية تحلل السكر وأنزيم نازعة الهيدروجين اللاكتات A (LDHA) وايضاً انزيم تصنيع اللاكتات monocarboxylat transporter4 (MCT4) و HIF 1 يسهل تكيف الميتوكوندريا مع نقص الاكسجة، كما انه يبطل العمل

عقار دوائي أو حمية تحد من عملية النمو الموضعي للورم والنقائل يمثل تحدياً كبيراً للعلماء (Myers and Cantley, 1036, 2012). وقد وجد الباحثون منذ عقود بأن الخلايا السرطانية تستخدم عملية استقلاب أسرع من الخلايا الطبيعية في الجسم، وبأن الخلايا السرطانية يزيد استهلاكها للجلوكوز لتغذيتها ونموها بسرعة. تعد سرطانات الحفرة الفموية من المشاكل الأساسية في العالم، وتتنبأ منظمة الصحة العالمية باستمرار انتشارها وارتفاع عدد المصابين بها سنوياً. أضافت كذلك أن انتشاره الأساسي الأول في دول آسيا الجنوبية فيما تشكل الإصابة 2% فقط من السرطانات في كل من الولايات المتحدة والمملكة المتحدة. ويشكل السرطان شائك الخلايا الفموي 90% من هذا السرطانات (Akhter *et al.*, 2011, 168)، وهو سادس أكثر السرطانات شيوعاً في العالم، هو ورم بشروي غازٍ موضعي له عدة درجات نسيجية ويملك القدرة لإعطاء نقائل إلى العقد اللمفية. يصيب السرطان عادة الأشخاص في الأعمار المتقدمة والذكور بنسبة أعلى من الإناث (Curado and Boyle, 2013, 234). سرطان SCC هو ورم خبيث يحدث ضمن مواقع تشريحية متعددة، مسؤولاً عن وفيات كبيرة بسبب عدم كفاية الخيارات العلاجية (Hsieh *et al.*, 2019, 1879). سرطان SCC هو صنف رئيسي من الأورام الخبيثة الناشئة من الخلايا الحرشفية للظهارة ومسؤول عن أكثر من مليون حالة وفاة بالسرطان سنوياً في جميع أنحاء العالم (Dotto and Rustgi, 2016, 639). ووضعت منظمة الصحة العالمية عام 2005 تسمية لبعض الاضطرابات التي يمكن ان تتحول إلى السرطان الفموي بالاضطرابات التي إمكانية التحول الخبيث (Potential Malignant Disorders, PMD)، حيث أنه ليس بالضرورة أن تتحول كلها إلى سرطان فموي، فخطورة هذه الاضطرابات تختلف وفقاً لمجموعة من العوامل المتعلقة بالمرضى أو الآفة، ويجب على الطبيب وضع خطة علاج بناءً على تقييم كل حالة، والعوامل المرتبطة بزيادة

الجلوكوز الزائد على شكل غليكوجين والذي يتحرر في أوقات الصيام ويشتق أيضاً من منتجات تكسير الدهون والبروتينات من خلال عملية استحداث السكر gluconeogenesis. بمجرد دخول الجلوكوز إلى الجسم، فإنه ينتقل عبر الدم والأنسجة التي تتطلب طاقة وهناك يبدأ تكسير الجلوكوز في سلسلة من التفاعلات الكيميائية الحيوية التي تطلق الطاقة على شكل ATP (Hantzidiamantis and Lappin, 2019). أصدرت جمعية القلب الأمريكية American Heart Association AHA بياناً علمياً يوصى بعدم تناول أكثر من 100 سعرة حرارية في اليوم (6 ملاعق صغيرة أو 24 غراماً) للنساء ولا تزيد عن 150 سعرة حرارية في اليوم (9 ملاعق صغيرة أو 36 غراماً) للرجال من السكريات (Rippe and Angelopoulos, 2015, 503)، (Johnson *et al.*, 2009, 1020). وتخفيض من استهلاك السكر يمكن ان يقلل بشكل كبير من عبء الأمراض ويجب انشاء مبادرات وتدخلات في الصحة العامة لإرشاد الإنسان نحو الاستهلاك المنخفض للسكر (Gupta *et al.*, 2018, 551).

يساهم السكر الزائد واتباع نظام غذائي غني بالسكريات المضافة في الإجهاد التأكسدي مما يؤدي إلى حدوث الالتهابات ويؤدي إلى أمراض مزمنة (Rippe and Angelopoulos, 2016, 697) تشمل: أمراض القلب التاجية والاعوية الدموية Cardiovascular disease (Yin *et al.*, 2020, 89)، السكري النمط الثاني، ومقاومة الانسولين والسمنة (Grimes *et al.*, 2013, 14)، السرطان (Makarem *et al.*, 2018, 39)، فرط أنسولين الدم وارتفاع ضغط الدم (Kim and Je, 2016, 53)، عامل رئيسي مسبب لتسوس الاسنان (Lagerweij and Van Loveren, 2020, 76).

تتصف الخلايا الورمية الخبيثة بحاجتها المرتفعة للطاقة وينجم عن ذلك استقلابها للمواد السكرية بشكل متزايد، وأهمها هو سكر الجلوكوز، يعتبر تأثير النظام الغذائي في الوقاية وعلاج السرطان مجالاً مهماً، وبناءً على ذلك فإن إيجاد علاج أو

للهامستر. تألفت العينة الدراسية من مجموعة من الهامسترات بلغ عددهم 40 هامستر سوري، حيث حُضِنوا في حواضن كلية الصيدلة_ جامعة دمشق وخضعوا للظروف ذاتها من حيث الإنارة، وتم اختيارها بحيث تكون متقاربة في الوزن حيث كان وزنها في الأسبوع الأول يتراوح بين 50_80 غراماً. تم اختيار حيوانات الهامستر لأن طبيعتها تتناسب مع طريقة البحث المتبعة وذلك لوجود الجيب الخدي المبطن ببشرة رصفية مطبقة، والمنفصل عن الحفرة الفموية ما يسهل تطبيق المادة المسرطنة ضمنه واستحداث سرطان شائك الخلايا ومتابعة تطوره.

تم تقسيم الهامسترات إلى مجموعتين رئيسيتين حيث ضمت كل مجموعة 20 هامستر المجموعة الأولى طبق عليها المادة المسرطنة ضمن الجيب الخدي وبمعدل ثلاثة أيام في الأسبوع مع إتباع حمية غذائية غنية بسكر الغلوكوز، بينما المجموعة الثانية طبق عليها المادة المسرطنة بمعدل ثلاثة أيام في الأسبوع مع إتباع حمية غذائية خالية من سكر الغلوكوز.

قسمت كلتا المجموعتين الأولى والثانية إلى أربع فئات تضم كل منها خمسة حيوانات، وتم التضحية بخمسة حيوانات من المجموعة الأولى وخمسة حيوانات من المجموعة الثانية بعد أسبوعين، وكررت عملية التضحية بعد ستة أسابيع وبعد عشرة أسابيع وبعد أربعة عشر أسبوعاً، وذلك لدراسة التغيرات الحادثة في جيب الهامستر مع تقدم الزمن ودراسة تأثير الحمية الغذائية على السلوك النسيجي لتطور السرطان شائك الخلايا. وإمتدت التجربة بين فترة نيسان إلى أيلول من عام 2021.

مواد البحث:

المادة المسرطنة: اخترنا مادة DMBA لإحداث السرطان في الجيب الخدي للهامستر، وهي من المركبات الفحم الهيدروجينية العطرية المصنعة من قبل شركة SEGMA. تم استخدامها بعد مزج 1 غرام منها في 200 مل من الزيت المعدني مع التسخين والتحرك حتى تم التجانس، وتم استخدام

الخطر وتحولها للخبائة ترتبط بالجنس وموقع ونوع وحجم الآفة والعيادات مثل التدخين واستهلاك الكحول ووجود علائم سوء التصنع البشري عند الفحص النسيجي (Speight *et al.*, 612, 2018)، وتشمل بعض هذه الاضطرابات (الطلاوة البيضاء Leukoplakia، الطلاوة الحمراء Erythroplakia، آفات الحنك الناتجة عن التدخين المعكوس Palatal lesion of reversed cigar smoking، الحزاز المنبسط الفموي Oral Lichen Planus، التليف تحت المخاطي الفموي Oral Submucosal Fibrosis وبعض الاضطرابات الوراثية Warnakulasuriya *et al.*, 2007,) (Hereditaty disorders)، يتراوح إنداز التحول إلى خبائة بالنسبة للطلاوة البيضاء الفموية بين 15 إلى 35% (Kyalvizhi *et al.*, 18)، وفي الأونة الأخيرة انتشرت فكرة ان السكر يغذي الخلايا الورمية من قبل اخصائيين الصحة وضمن وسائل الاعلام المختلفة، وبدأ الأطباء الآن في التفكير أكثر في المغذيات التي تغذي الخلايا السرطانية وكيف يمكن ان يؤثر ما نأكله على كيفية نمو السرطان. وما إذا كانت هناك طرق لتجويد الخلايا السرطانية دون ترك الشخص يعاني من نقص التغذية، ومن هنا انطلقنا في اجراء هذا البحث لمعرفة تأثير الحمية الغذائية الحاوية أو الخالية من سكر الغلوكوز على السلوك النسيجي لتطور السرطان شائك الخلايا الفموي وعلاقتها بنقص الأكسجة.

الهدف من البحث:

دراسة تأثير الحمية الغذائية الغنية بسكر الغلوكوز او الخالية من سكر الغلوكوز على بيئة نقص الأكسجة الورمية من خلال دراسة تعبيرية البروتين HIF1 α .

تصميم الدراسة:

اعتمدنا في هذا البحث إجراء مقارنة بين الحمية الغذائية الحاوية على سكر الغلوكوز والحمية الخالية من سكر الغلوكوز وذلك من حيث تأثيرها على السلوك النسيجي اثناء تطور السرطان شائك الخلايا الفموي المستحدث في الجيب الخدي

- تُفرش في حمام مائي يحتوي الماء المقطر بدرجة حرارة 40-45%. تُزال التجاعيد ويتم فصل المقاطع المتصلة.
2. يتم حمل القطعة الشمعية الحاوية للنسيج على لامة خاصة بالتلوين المناعي. وتوضع اللامات في فرن بدرجة حرارة ثابتة 55 مئوية مدة ساعتين. وتُمرر اللامات على حمامين من الكزيلول بغية إزالة البارافين
3. تجفف اللامات من الكزيلول بتمريرها على حمامات من الكحول متتالية مدة خمس دقائق في كل حمام وتُغسل اللامات بعدها بلطف بالماء الجاري.
4. عملية استرجاع المستضد: توضع اللامات ضمن وعاء فيه المحلول المسترجع للمستضد، تكون كميته كافية وتغمر اللامات. يوضع الوعاء في المايكرويف ويترك مدة عشر دقائق بعد وصوله لدرجة الغليان. ثم يُترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة حوالي 20 دقيقة. توضع اللامات في وعاء يحتوي على المحلول الدارى PBS مدة خمس دقائق وتُعاد هذه الخطوة مرة أخرى.
5. يزال المحلول الدارى من على اللامات ومن حول العينة بلطف وباستخدام المناديل الورقية. ونحدد باستخدام قلم التحديد من Dako حول الجزء النسيجي من العينة المراد تلوينه مناعياً. يُطبق Poly detector peroxidase blocker على الجزء المحدد من العينة على اللامة بحيث يغطيها كاملة، ويترك مدة خمس دقائق. غسل اللامات من أثر البيروكسيداز باستخدام المحلول الدارى. تُوضع اللامات مرة أخرى في حمام من المحلول الدارى مدة خمس دقائق. تطبيق الضد الأولي للـ HIF-1 α Primary anti-body: يُطبق الضد الأولي باستخدام الممص (Pipette) ليغطي القطعة النسيجية داخل حدود قلم التحديد بالكامل. ويترك مدة 45 دقيقة وتُغسل اللامات بعدها بالمحلول الدارى وتوضع في حمام المحلول الدارى مدة خمس دقائق.

كمادات خاصة وذلك لتجنب الأبخرة السامة الناتجة عن عملية التحضير وحفظها في زجاجة بنية ليتم استخدامها في البحث. استخدمت فرشاة تلوين خشبية وذات حجم 4 لتطبيق المادة في الجيب الخدي للهامستر بمعدل ثلاثة مرات في الأسبوع مع مراعاة تغيير الفرشاة كل أسبوعين والانتباه لتغيير رقمها تبعاً لتغيير حجم الهامسترات مع مرور الوقت. مع ملاحظة أن التطبيق كان يتم على الجيب الخدي في الطرف الأيسر وذلك لاستحداث السرطان البشري شائك الخلايا ضمنه، ولضمان مقدرة الهامستر على تناول غذائه وتخزينه وذلك باستخدام الجيب الخدي في الطرف الأيمن مما يساعد على الحفاظ على حياة الهامستر وعدم تعرضه للموت الناتج عن نقص التغذية (Pourshahidi *et al.*, 2019, 402).

طرائق البحث:

أدوات التضحية بحيوانات الهامستر وأخذ الخزعات وهي: (حامل مشرط، شفرات، ملقط، قطن، كلوروفورم للتخدير، وعبوات الفورمالين، محم صهر الشمع والاندماج)، تم تخدير حيوانات الهامستر المراد التضحية بها باستخدام الكلوروفورم حيث تم الموت بتنشيط التنفس.

طريقة تحضير الشرائح: تتبع الخزعات بعد الاستئصال التسلسل التالي: التثبيت: بعد استئصال عينة البحث وهي عبارة عن الجيب الخدي، تم وضعها حول أمبولة تخدير سنوية وذلك للمحافظة على الشكل الفراغي للجيب الخدي ومنع انكماشه ضمن الفورمول، ومن ثم غمرت في الفورمول الممدد 10% لمدة 24 ساعة، وذلك لتثبيت العينة ومنع التطل الذاتي للأنسجة، يتم بعد ذلك تحضير العينة من أجل إدماجها بشمع البارافين، لكي تصبح العينة صلبة وقابلة للقطع.

التلوين المناعي:

1. يُثبت القلب الشمعي الحامل للعينات النسيجية على المباشرة النسيجية وتُحدد ثخانة القطع بـ 4 ميكرونات،



الصورة (3): أدوات تطبيق المادة المسرطنة



الصورة (4): تأثير تطبيق المادة المسرطنة



الصورة (5): تظهر عملية استئصال الجيب الخدي



الصورة (6): ظروف المحلول الدارىء (TBST) من Dako

6. تطبيق Poly Detector HRP Label بواسطة الممص مدة 45 دقيقة. ثم تُغسل بالمحلول الدارىء وتحضن بحمام من المحلول الدارىء لمدة خمس دقائق.

7. تطبيق DAB Substrate-Chromogen: حُضِر حسب تعليمات الشركة المنتجة كتالي: تم حل قطرة واحدة من Poly detector DAB chromogen لكل 1ملى من DAB buffer. يُمزج بشكل جيد ضمن عبوة مناسبة عازلة للضوء. يطبق المحلول الذي حصلنا عليه على العينة النسيجية المحددة ليغطيها كاملةً لمدة عشرة دقائق، ثم بعدها غسل اللامات بالماء المقطر عدة مرات.

8. تطبيق الهيماتوكسيلين على اللامات مدة 30 دقيقة، ثم تُغسل بالماء. جُففت من الماء بتمريرها على حمامات متتالية من الكحول (70% ثم 95% ثم الكحول المطلق) لمدة خمس دقائق في كل حمام وسُترت اللامات بالساترات الزجاجية بعد وضع بلسم كندا عليها.



الصورة (1): تظهر تقسيم الهامسترات إلى مجموعات



الصورة (2): المادة المسرطنة المستخدمة

المجموعتين مقسمة إلى أربع مجموعات فرعية متساوية وفقاً لزمّن التضحية (بعد أسبوعين اثنين، وبعد ستة أسابيع، وبعد 10 أسابيع، وبعد أربعة عشر أسبوعاً)، إذ تم أخذ خزعة واحدة من الجيب الخدي لكل حيوان هامستر في عينة البحث وتم الحصول على محضرات نسيجية متطابقة من كل خزعة من الخزعات المدروسة في عينة البحث، تم إجراء التلوين التلقيدي بالهيماتوكسيلين والإيوزين وتحديد مراحل التطور النسيجي مع مرور الزمن حيث تم تسجيل حالتي فرط تصنع وحالة من سوء التصنع البسيط وحالتي من سوء التصنع المتوسط بعد أسبوعين من تطبيق المادة المسرطنة في مجموعة دراسة تطبيق الحماية الغذائية الحاوية على السكر، بينما في المجموعة دراسة الحماية الغذائية الخالية من السكر تم تسجيل حالتي فرط تقرن وحالتي فرط تصنع وحالة سوء تصنع بسيط. بعد ستة أسابيع من التجربة تم تسجيل حالتي من سوء التصنع المتوسط وحالة من سوء التصنع الشديد وحالتي سرطان موضع في المجموعة الأولى، مقابل حالة من فرط التصنع وحالة من سوء تصنع بسيط وحالتي من سوء التصنع المتوسط وحالة سوء تصنع شديد في المجموعة الثانية. بعد عشر أسابيع من التجربة تم تسجيل حالة سوء تصنع الشديد وحالتي سرطان موضع وحالتي سرطان شائك الخلايا من الدرجة الأولى في المجموعة الأولى، بينما سجلت حالة سوء تصنع المتوسط وحالتي من سوء التصنع الشديد وحالتي من السرطان موضع في المجموعة الثانية. بعد أربعة عشر أسبوعاً من التجربة تم تسجيل خمس حالات سرطان شائك الخلايا، بينما سجلت حالة سوء تصنع شديد وحالتي سرطان موضع وحالتي سرطان شائك الخلايا في المجموعة الثانية.

وتم إجراء التلوين المناعي بالضد HIF-1 α .



الصورة (7): محلول إسترجاع المستضد Dako



الصورة (8): الكيت المناعي المفرد من Bio-SB

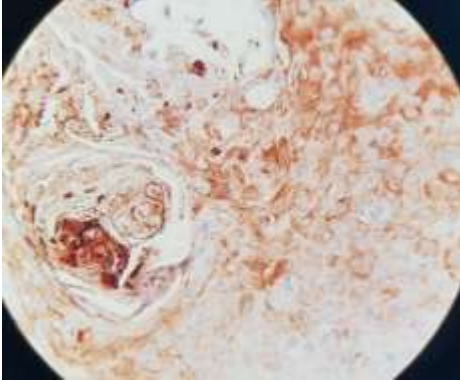


الصورة (9): الضد HIF-1 α وهو ملون هيولى

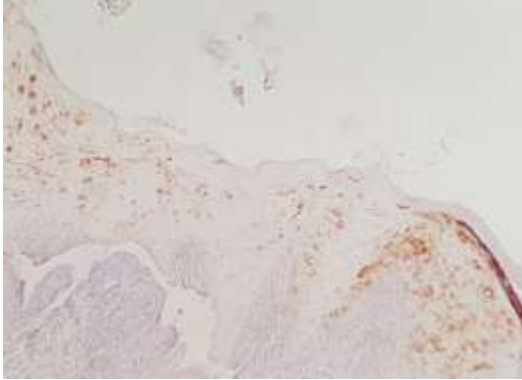
النتائج والدراسة الإحصائية:

وصف العينة:

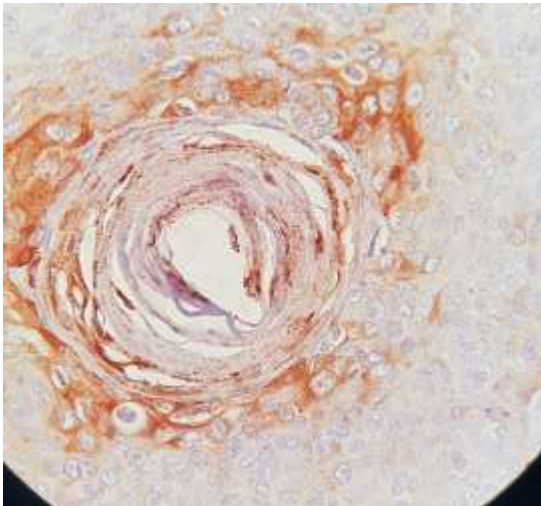
تألّفت عينة البحث من 40 خزعة نسيجية من الجيب الخدي لحيوان الهامستر، وكانت حيوانات الهامستر في عينة البحث مقسمة إلى مجموعتين (مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية تحتوي على السكر، مجموعة تطبيق المادة المسرطنة دون وجود السكر في الحماية الغذائية، وقد كانت كل من



الصورة (11): تظهر تعبيرية HIF-1 α في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حمية حاوية على السكر بعد 14 اسبوع.



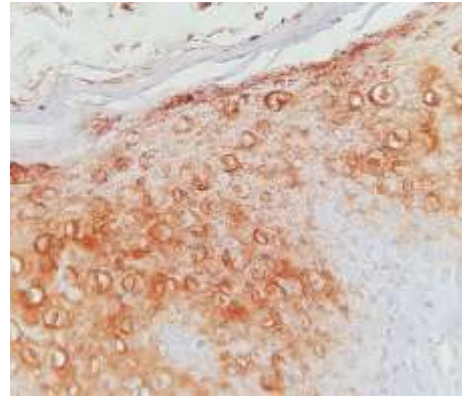
الصورة (12): تظهر تعبيرية HIF-1 α في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حمية خالية من السكر بعد اسبوعين.



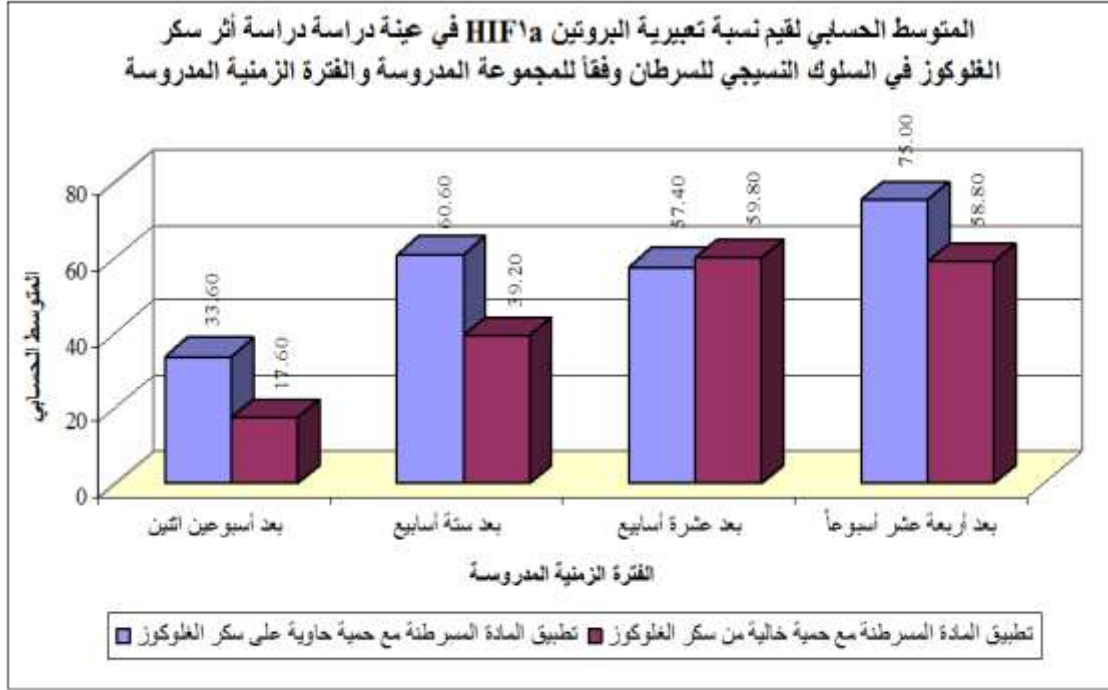
الصورة (12): تظهر تعبيرية HIF-1 α في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حمية خالية من السكر بعد 14 أسبوع

الجدول (1): يوضح نتائج تعبيرية بروتين HIF-1 α وفقاً للحمية المطبقة والفترة الزمنية المدروسة
نتائج مراقبة تعبيرية بروتين HIF1 α في العينة وفقاً للفترة الزمنية المدروسة:

الحمية المطبقة	الفترة الزمنية	نسبة تعبيرية HIF-1 α
حمية حاوية على سكر الجلوكوز	بعد اسبوعين	33.6
	بعد 6 اسابيع	60.6
	بعد 10 اسابيع	57.4
	بعد 14 اسبوع	75
حمية خالية من سكر الجلوكوز	بعد أسبوعين	17.6
	بعد 6 اسابيع	39.2
	بعد 10 اسابيع	59.8
	عد 14 اسبوع	58.8



الصورة (10): تظهر تعبيرية HIF-1 α في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حمية حاوية على السكر بعد اسبوعين.



المخطط رقم (1): يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α في عينة دراسة أثر سكر الجلوكوز في السلوك النسيجي للسرطان وفقاً للمجموعة المدروسة والفترة الزمنية المدروسة.

الدراسة الاحصائية:

تم إحصاء أعداد الخلايا الإيجابية التي أبدت تعبيرية للبروتين HIF-1 α ، وفي كل مجموعة خلايا من مجموعات الخلايا المدروسة في كل محضّر نسيجي من المحضّرات المدروسة، وتم حساب النسبة المئوية الموافقة لكل محضّر نسيجي من المحضّرات النسيجية المدروسة كما المعدلات التالية:

$$\text{نسبة الخلايا ذات تعبيرية البروتين HIF-1}\alpha \text{ في كل محضّر نسيجي من مجموعة دراسة تعبيرية البروتين HIF-1}\alpha = \left(\frac{\text{عدد الخلايا المتلونة (4 ساعات)}}{\text{عدد الخلايا الكلي (4 ساعات)}} \right) \times 100 \text{ للمحضر نفسه.}$$

دراسة تعبيرية بروتين HIF-1 α :

تم إجراء اختبار T ستينودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α بين مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز ومجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز في العينة المدروسة، وذلك وفقاً للفترة الزمنية المدروسة كما يلي:

الجدول (2): يبين الإحصاءات الوصفية ونتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1α بين مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز ومجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز في عينة دراسة أثر سكر الجلوكوز في السلوك النسيجي للسرطان، وذلك وفقاً للفترة الزمنية المدروسة

نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة:

المتغير المدروس = نسبة تعبيرية البروتين HIF1α										
الفترة الزمنية المدروسة	المجموعة المدروسة	عدد الخزعات النسيجية	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى	الفارق بين المتوسطين	قيمة t	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
بعد أسبوعين اثنين	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز	5	33.60	12.70	19	54	16.00	2.768	0.024	توجد فروق دالة
	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز	5	17.60	2.41	15	21				
بعد ستة أسابيع	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز	5	60.60	5.18	54	65	21.40	2.302	0.0503	لا توجد فروق دالة
	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز	5	39.20	20.13	17	62				
بعد عشرة أسابيع	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز	5	57.40	9.96	46	65	-2.40	-	0.479	لا توجد فروق دالة
	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز	5	59.80	5.12	51	64				
بعد أربعة عشر أسبوعاً	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز	5	75.00	17.16	47	90	16.20	1.822	0.106	لا توجد فروق دالة
	تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز	5	58.80	10.03	41	65				

في عينة الدراسة، وبما أن الإشارة الجبرية للفروق بين المتوسطين موجبة نستنتج أن قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1α في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز كانت أكبر منها في مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز في مجموعة الفترة الزمنية (بعد أسبوعين اثنين) في عينة الدراسة. أما بالنسبة لكل من مجموعات الفترة الزمنية الباقية فيلاحظ في الجدول أعلاه

يُلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05 في مجموعة الفترة الزمنية (بعد أسبوعين اثنين)، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1α بين مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز ومجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز في مجموعة الفترة الزمنية (بعد أسبوعين اثنين)

أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α ، تم إجراء اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α بين مجموعات

الجدول رقم (3): يبين نتائج اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α بين مجموعات الفترة الزمنية المدروسة (بعد أسبوعين اثنين وبعد ستة أسابيع وبعد عشرة أسابيع وبعد أربعة عشر أسبوعاً) في عينة دراسة أثر سكر الجلوكوز في السلوك النسيجي للسرطان، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

نتائج اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA:

المتغير المدروس = نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α							
المجموعة المدروسة	الفترة الزمنية المدروسة	عدد الأزواج النسيجية	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى	قيمة f المحسوبة
دلالة الفروق	قيمة مستوى الدلالة						
تطبيق المادة المسرطنة مع حماية حاوية على سكر الجلوكوز	بعد أسبوعين اثنين	5	33.60	12.70	19	54	10.130
	بعد ستة أسابيع	5	60.60	5.18	54	65	
	بعد عشرة أسابيع	5	57.40	9.96	46	65	
	بعد أربعة عشر أسبوعاً	5	75.00	17.16	47	90	
تطبيق المادة المسرطنة مع حماية خالية من سكر الجلوكوز	بعد أسبوعين اثنين	5	17.60	2.41	15	21	14.731
	بعد ستة أسابيع	5	39.20	20.13	17	62	
	بعد عشرة أسابيع	5	59.80	5.12	51	64	
	بعد أربعة عشر أسبوعاً	5	58.80	10.03	41	65	

يلاحظ في الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر بكثير من القيمة 0.05 مهما كانت المجموعة المدروسة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط قيم نسبة تعبيرية البروتين HIF1 α بين اثنتين على الأقل من مجموعات الفترة الزمنية المدروسة الأربع المدروسة (بعد أسبوعين اثنين وبعد ستة أسابيع وبعد عشرة أسابيع وبعد أربعة عشر أسبوعاً) مهما كانت المجموعة المدروسة في عينة دراسة أثر سكر الجلوكوز في السلوك النسيجي للسرطان.

المناقشة:

نظراً لأن العديد من الخلايا السرطانية تتعرض لبيئة ناقصة التأكسج أثناء نمو الورم الخبيث، فنقص الاكسجة هو أحد علامات مرض السرطان الناجم عن عدم التوازن بين استهلاك الأكسجين ومن خلال تكاثر الخلايا السرطانية بسرعة وعدم كفاية إمدادات الاوعية الدموية وإن إعادة البرمجة الاستقلاب

من الفسفرة التأكسدية إلى تحلل السكر في السيتوبلازما يتم التعرف عليه كأحد جوانب الاستجابة التكيفية للخلايا السرطانية لنقص الأكسجة لتلبية متطلبات الاستقلاب الغذائي والطاقة الحيوية (Nagao *et al.*, 2019, 238). تتمثل إحدى الآليات لنقص الأكسجة في الانسجة الورمية في تنشيط HIF-1، العامل المحرض لنقص الأكسجة وهو عامل نسخ يشارك في التسرطن ونمو الورم، وينظم التمثيل الغذائي للجلوكوز (Batelja *et al.*, 2021, 336). يتم التعبير عن HIF-1 α بشكل مفرط في الأورام البشرية العدوانية، ويلعب دوراً حاسماً في تطور الورم ومن خلال تنظيم الجينات المستهدفة، مما يحفز إفراز العوامل المسببة لتوليد الاوعية لتسريع نمو الورم ويسهل العديد من العمليات البيولوجية المرتبطة بتحلل السكر وبالتالي يمكن ان تعيش الخلايا السرطانية في بيئة ناقصة الاكسجة من خلال تنظيم HIF-1 α (Chu *et al.*, 2021, 1057).

لا يعرف الكثير عن دور HIF-1 α في المراحل المبكرة من التسرطن فكان الهدف من دراستنا هو دراسة تعبيريته في المراحل المبكرة من تطور السرطان مع الحميات الغذائية الحاوية والخالية من السكر، ومن هنا انطلقنا في التحري عن التعبيرية المناعية الكيميائية النسيجية للـ HIF-1 α في عينة تجربة بحثنا، فقد وجدنا زيادة في تعبيرية HIF-1 α في عينات المجموعة الأولى (مجموعة تطبيق المادة المسرطنة مع حماية غنية بالسكر) على الرغم من عدم وجود فروق دالة إحصائياً بين المجموعتين مع مرور الزمن، إلا ان الحماية الغذائية الخالية من السكر قد ابطئت تطور سرطان شائك الخلايا واثبتت دراستنا ان الحماية الخالية من السكر قللت من تعبيرية HIF-1 α أي قللت من البيئة ناقصة التأكسج اثناء تطور السرطان وهذا مهم في الوقاية من سرطان شائك الخلايا الفموي.

يعتبر نقص الأكسجة أحد السمات المميزة للسرطان وقد ظهر في أنواع مختلفة من الأورام الصلبة بما فيها سرطان الخلايا الحشوية في الرأس والرقبة (Patel *et al.*, 2019, 435). وتوافقت نتائج بحثنا مع دراسة Krishan حيث أظهرت نتائج بحثه أن العلاج بالنظام الغذائي المقيد بالكربوهيدرات في الجرذان المصابة بداء السكري يخفف الضرر الكلوي عن طريق تقليل الإجهاد التأكسدي ومنع تطور نقص الأكسجة عن طريق تقليل مستويات HIF1 α (Krishan *et al.*, 2017, 10).

يتمثل إحدى الآليات لنقص الأكسجة في الانسجة الورمية في تنشيط HIF-1، العامل المحرض لنقص الأكسجة وهو عامل نسخ يشارك في التسرطن ونمو الورم، وينظم التمثيل الغذائي للجلوكوز (Batelja *et al.*, 2021, 336). يتم التعبير عن HIF-1 α بشكل مفرط في الأورام البشرية العدوانية، ويلعب دوراً حاسماً في تطور الورم ومن خلال تنظيم الجينات المستهدفة، مما يحفز إفراز العوامل المسببة لتوليد الاوعية لتسريع نمو الورم ويسهل العديد من العمليات البيولوجية المرتبطة بتحلل السكر وبالتالي يمكن ان تعيش الخلايا السرطانية في بيئة ناقصة الاكسجة من خلال تنظيم HIF-1 α (Chu *et al.*, 2021, 1057).

يعمل اثنا عشر نوعاً من ناقلات الجلوكوز GLUT في امتصاص الجلوكوز في الخلايا البشرية ومن المعروف على نطاق واسع ان التعبير عن انزيم تحديد معدل تحلل السكر الـ GLUT-1 يخضع لتنظيم إيجابي لـ HIF (Nagao *et al.*, 2019, 238). HIF يمكن ان يظل مستقراً في ظل ظروف نقص الاكسجة اثناء توجيه الأعلى من الجينات (GLUT1 و PDK1) التي تعمل على زيادة تحلل السكر (Xu *et al.*, 2021, 6686).

تم ربط مقاومة العلاج والنتائج السيئة للمرض بنقص الأكسجة في العديد من أنواع السرطان، بما في ذلك الرئة والثدي والبروستات والورم الدبقي وتم ربطه مع ضعف البقاء على قيد الحياة، ومع تطور الورم والاستعمار (Ribeiro *et al.*, 2017, 39). ففي دراسة اثبتوا فيها ان تثبيط HIF-1 α له دور بمنع تكاثر الخلايا السرطانية البشرية واستهداف الـ HIF-1 α يمثل استراتيجية قابلة للتطبيق لتطور أدوية للسرطان (Chu *et al.*, 2021, 1057). قد يكون استهداف إشارات HIF-1 α وسيلة فعالة لعلاج السرطانات المقاومة للعلاج التقليدي (Nishimoto *et al.*, 2021, 1057).

من التجارب السريرية التي تستهدف النظام الغذائي كمدخل لمرضى السرطان. والدراسات تتجه نحو مجموعة من الفحوصات المخبرية والسريرية لتحديد ما إذا كان تعديل المدخول الغذائي للمريض يمكن ان يغير من المسارات الجزيئية لمنع التطور التلقائي للسرطان (Fair and Montgomery, 2009, 57). وتعد الاستراتيجيات العلاجية الجديدة لتحسين العلاج الكيميائي والعلاج الإشعاعي والعلاج الموجه هدفاً مهماً في أبحاث السرطان. وتعتبر التداخلات الغذائية جذابة كونها غير مكلفة.

الاستنتاجات:

- تطور السرطان شائك الخلايا بشكل أسرع مع الحماية الحاوية على سكر الجلوكوز، اي ان OSCC يعتمد على الجلوكوز كمصدر غذائي من خلال سرعة تطور وتقدم السرطان.
- وتقليل السكريات تبطئ من تطور الورم وتقلل من البيئة نقص الأكسجة للسرطان شائك الخلايا الفموي فالحماية الغذائية الخالية من السكر قد تكون علاج داعم إلى جانب العلاج التقليدي.

التوصيات:

- نحتاج إلى مزيد من الدراسات على المستوى الجزيئي لدراسة تأثير الحماية الغذائية على السلوك النسيجي لل OSCC.
- إجراء دراسة سريرية لاختبار تأثير النظام الغذائي وتأثيره على سلوك OSCC
- إجراء استبيانات لوضع بروتوكول لإتباع الحماية الغذائية المناسبة لمرضى OSCC.
- إدراك كمية السكر المضاف إلى نظام الغذائي يعد خطوة صحية يجب إتخاذها.

وفي دراسة لتقييم تعبيرية HIF-1 α في حالات خلل التنسج ودرجات OSCC وجدت زيادة تدرجية لتعبيرية HIF-1 α من درجات سوء التصنع إلى سرطان شائك الخلايا (Patel *et al.*, 2019, 435)، وهذا توافق مع نتائج بحثنا ولكن في بحثنا كانت مستوى تعبيرية HIF-1 α أعلى في المجموعة الأولى من المجموعة الثانية أي زيادة الجلوكوز ارتبطت مع مستويات مرتفعة لـ HIF-1 α .

في دراسة مخبرية وسريرية، وجدوا ان HIF-1 α يرتبط مع إنذار سيء لمرضى OSCC، ومن الناحية المخبرية التي تمت على الفئران المستحدث لديهم السرطان تم فيها علاج الفئران بمثبط HIF-1 α (NF-KB inhibitor) فوجدوا انه يعطي نتائج علاجية جيدة من خلال مقارنة وزن حجم الأفة مع المجموعة الضابطة (Han *et al.*, 2020, 65).

وفي دراسة للتحقق في الارتباط بين مستوى تعبيرية HIF-1 α مع glycosylation في OSCC، عن طريق التلوين الكيميائي المناعي النسيجي في 30 حالة مشخصة بـ OSCC، كما تم دراسة تعبيرية بروتينات المرتبطة بـ glycosylation ، فوجدوا زيادة تعبيرية البروتينات المرتبطة بـ glycosylation مع زيادة في تعبيرية HIF-1 α في OSCC، ويزداد مستوى التعبيرية بشكل يتناسب مع حجم الورم. كما أدى تثبيط HIF-1 α بواسطة PX-478 إلى انخفاض في مستويات تعبيرية بروتينات المرتبطة بـ glycosylation (Xu *et al.*, 2021, 6686). وهذا يتوافق مع نتائج بحثنا فارتبطت زيادة تعبيرية HIF-1 α مع الحماية الغنية بسكر الجلوكوز.

وعلى الرغم من وفرة المعلومات حول استقلال السرطان وطريقته الخاصة باستهلاك الجلوكوز، إلا ان هناك عدد قليل

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. AKHTER, M., HOSSAIN, S., RAHMAN, Q. B. & MOLLA, M. R. 2011. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 15, .168
2. BATELJA-VULETIC, L. ,TOMASOVIC-LONCARIC, C., CEPPI, M., BRUZZONE, M., FUCIC, A., KRSTANAC, K. & BORAS VUCICEVIC, V. 2021. Comparison of Androgen Receptor, VEGF, HIF-1, Ki 67and MMP 9Expression between Non-Metastatic and Metastatic Stages in Stromal and Tumor Cells of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Life (Basel)*, 11(4), 336.
3. CAIRNS, R. A., HARRIS, I. S. & MAK, T. W. 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11, .95-85
4. CHU, P. C., WU, Y. C., CHEN, C. Y., HUNG, Y. S. & CHANG, C. S. 2021. Novel HIF-1alpha inhibitor CDMP-TQZ for cancer therapy. *Future Med Chem*, 13, .1072-1057
5. CURADO, M. P. & BOYLE, P. 2013. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Current opinion in oncology*, 25, .234-229
6. DOTTO, G. P. & RUSTGI, A. K. 2016. Squamous cell cancers: a unified perspective on biology and genetics. *Cancer cell*, 29, .637-622
7. EL MJIYAD, N., CARO-MALDONADO, A. ,RAMIREZ-PEINADO, S. & MUNOZ-PINEDO, C. 2011. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene*, 30, 253-264
8. EVANS, R. D. & HEATHER, L. C. 2019. Human metabolism: pathways and clinical aspects. *Surgery (Oxford)*, 37, .309-302
9. FAIR, A. M. & MONTGOMERY, K. 2009. Energy balance, physical activity, and cancer risk. *Cancer Epidemiology*. Springer.
10. GATENBY, R. A., GAWLINSKI, E. T., GMITRO, A. F., KAYLOR, B. & GILLIES, R. J. 2006. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer research*, 66, .5223-5216
11. GRIMES, C. A., RIDDELL, L. J., CAMPBELL, K. J. & NOWSON, C. A. 2013. Dietary salt intake, sugar-sweetened beverage consumption, and obesity risk. *Pediatrics*, 131, .21-14
12. GUPTA, L., KHANDELWAL, D., DUTTA, D., KALRA, S., LAL, P. R. & GUPTA, Y. 2018. The Twin White Herrings: Salt and Sugar. *Indian J Endocrinol Metab*, 22, .551-542
13. HAN, S., YIN, X., WANG, Y., XU, W. & CHENG, W. 2020. Co-expression of HIF- 1and TLR 3is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 13, .72-65
14. HANTZIDIAMANTIS, P. J. & LAPPIN, S. L. 2019. Physiology, Glucose.
15. HSIEH, M.-H., CHOE, J. H., GADHVI, J., KIM, Y. J., ARGUEZ, M. A., PALMER, M., GEROLD, H., NOWAK, C., DO, H. & MAZAMBANI, S. 2019. p 63and SOX 2dictate glucose reliance and metabolic vulnerabilities in squamous cell carcinomas. *Cell reports*, 28, .1878-1860e.9
16. JOHNSON, R. K., APPEL, L. J., BRANDS, M., HOWARD, B. V., LEFEVRE, M., LUSTIG, R. H., SACKS, F., STEFFEN, L. M. & WYLIE-ROSETT, J. 2009. Dietary sugars intake and cardiovascular health: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 120, .1020-1011
17. KAELIN JR, W. G. & THOMPSON, C. B. 2010. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature*, 465(7298), 562-564
18. KAYALVIZHI, E., LAKSHMAN, V., SITRA, G., YOGA, S., KANMANI, R. & MEGALAI, N. 2016. Oral leukoplakia: A review and its update. *Journal of Medicine, Radiology, Pathology and Surgery*, 2, .22-18
19. KIM, Y. & JE, Y. 2016. Prospective association of sugar-sweetened and artificially sweetened beverage intake with risk of hypertension. *Arch Cardiovasc Dis*, 109, .53-242

20. KRISHAN, P., SINGH, G & BEDI, O. 2017. Carbohydrate restriction ameliorates nephropathy by reducing oxidative stress and upregulating HIF-1 α levels in type-1 diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord*, 16, .47
21. KROEMER, G. & POUYSSEGUR, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*, 13, .482-472
22. LAGERWEIJ, M. & VAN LOVEREN, C. 2020. Chapter 7: Sugar and Dental Caries. *Monogr Oral Sci*, 28, .76-68
23. MAKAREM, N., BANDERA, E. V., NICHOLSON, J. M. & PAREKH, N. 2018. Consumption of sugars, sugary foods, and sugary beverages in relation to cancer risk: a systematic review of longitudinal studies. *Annual review of nutrition*, 38, 17-39.
24. MAMMUCARI, C., GHERARDI, G. & RIZZUTO, R. 2017. Structure, activity regulation, and role of the mitochondrial calcium uniporter in health and disease. *Frontiers in oncology*, 7, .139
25. MANNA, D., AKHTAR, S., MAITI, P., MONDAL, S., KUMAR MANDAL, T. & GHOSH, R. 2020. Anticancer activity of a 1,4-dihydropyridine in DMBA-induced mouse skin tumor model. *Anticancer Drugs*, 31(4), 394-402
26. MYERS, A. P. & CANTLEY, L. C. 2012. Sugar free, cancer free? *Nutrition*, 28, .1036
27. NAGAO, A., KOBAYASHI, M., KOYASU, S., CHOW, C. C. & HARADA, H. 2019. HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance. *International journal of molecular sciences*, 20, .238
28. NISHIMOTO, A., KUGIMIYA, N., HOSOYAMA, T., ENOKI, T., LI, T. S. & HAMANO, K. 2014. HIF-1 α activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol*, 44, .84-2077
29. PATEL, N. R., JAIN, L., MAHAJAN, A. M., HIRAY, P. V., SHINDE, S. S. & PATEL, P. A. 2019. An Immunohistochemical Study of HIF-1 α in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, .441-435 ,71
30. PERIYANNAN, V., ANNAMALAI, V. & VEERASAMY, V. 2020. Syringic acid modulates molecular marker-involved cell proliferation, survival, apoptosis, inflammation, and angiogenesis in DMBA-induced oral squamous cell carcinoma in Syrian hamsters. *J Biochem Mol Toxicol*, 34, e.22574
31. POURSHAHIDI, S., HOSEINI, E. G., EBRAHIMI, H. & ALAEDDINI, M. 2019. A Model for Induction of Dysplasia in Hamster Mucosal Pouch. *Frontiers in Dentistry*.
32. REECE, J. B., URRY, L. A., CAIN, M. L., WASSERMAN, S. A., MINORSKY, P. V & JACKSON, R. B. 2011. Cellular respiration and fermentation. *Campbell Biology*, 163-183
33. RIBEIRO, M., TEIXEIRA, S. R., AZEVEDO, M. N., FRAGA, A. C., JR., GONTIJO, A. P. & VENCIO, E. F. 2017. Expression of hypoxia-induced factor-1 α in early-stage and in metastatic oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, 39, .1010428317695527
34. RIPPE, J. M. & ANGELOPOULOS, T. J. 2015. Sugars and health controversies: what does the science say? *Advances in Nutrition*, 6, 493S-503S.
35. RIPPE, J. M. & ANGELOPOULOS, T. J. .2016 Relationship between added sugars consumption and chronic disease risk factors: Current understanding. *Nutrients*, 8, .697
36. SEMENZA, G. L. 2010a. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 α in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*, 29, .625
37. SEMENZA, G. L. 2010b. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development*, 20, .56-51
38. SPEIGHT, P. M., KHURRAM, S. A. & KUJAN, O. 2018. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 125, .627-612

39. TRAN, Q., LEE, H., KIM, C., KONG, G., GONG, N., KWON, S. H., PARK, J., KIM, S.-H. & PARK, J. 2020. Revisiting the Warburg effect: Diet-based strategies for cancer prevention. *BioMed Research International*, 2020
40. VAUPEL, P. & MAYER, A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26, 239-225
41. WARBURG, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 314-309
42. WARNAKULASURIYA, S., JOHNSON, N. W. & VAN DER WAAL, I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine*, 36, 580-575
43. XU, X., LIU, H., WU, R., ZUO, W., WANG, T. & CHEN, D. 2021. Analysis of the correlation of the expression level of hypoxia-inducible factor-1 α with the glycosylation of oral squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res*, 13, 6693-6686
44. YE, T. L., LEISSING, T. M., ABOUD, M. I., THINNES, C. C., ATASOYLU, O., HOLT-MARTYN, J. P., ZHANG, D., TUMBER, A., LIPPL, K., LOHANS, C. T., LEUNG, I. K. H., MORCLETTE, H., CLIFTON, I. J., CLARIDGE, T. D. W., KAWAMURA, A., FLASHMAN, E., LU, X., RATCLIFFE, P. J., CHOWDHURY, R., PUGH, C. W. & SCHOFIELD, C. J. 2017. Molecular and cellular mechanisms of HIF prolyl hydroxylase inhibitors in clinical trials. *Chem Sci*, 8, 7668-7651
45. YIN, J., ZHU, Y., MALIK, V., LI, X., PENG, X., ZHANG, F. F., SHAN, Z. & LIU, L. 2020. Intake of Sugar-Sweetened and Low-Calorie Sweetened Beverages and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Adv Nutr*, 12(1), 89-101.
46. ZHOU, J., LI, C., YAO, W., MA, A., HUO, L., LIU, H. & MIAO, Y.-L. 2018. Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent autophagy plays a role in glycolysis switch in mouse granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 99(2), 308-318