

## **Dedication**

To soul of my father. .

To my mother who giving me the meaning of patience

and loyalty....

To my wife whose always support and encourage

me...

# Acknowledgment

I would like to thank Allah for giving me the ability to complete this work. I would like express wonderful people who have in one way or another supported me in this work.

In particular my sincere gratitude to my supervisor Prof. Dr. Hussain Gadelkarim for his guidance, sharing his immense knowledge in the field, for the enormous amount of work, time, energy and support.

Also I would like to express my sincere gratitude to my co-supervisor Dr. Monira Abdallah for her sharing immense knowledge .

My thanks go to Dr. Ali Yousif and Dr. Saad Alnoor for their help in practical part, and crucial contribution.

Also I thank the staff of Radiation Isotope centre-Khartoum particularly Miss. Nada saleh and Alribat hospital laboratory staff particularly Miss. Afaf, Miss. Eslam, and Mr. wail for their assistant of sample collection.

Finally, I would like to thank everyone who encouraged me, as well as expressing my apology to those who I could not mention them.

Faris Marghany

## ملخص الدراسة

هذه دراسة وصفية مستعرضة، أجريت في ولاية الخرطوم خلال الفترة من يناير 2012 - يناير 2015. الدراسة كانت تهدف إلى تقييم العلاقة بين فيروس الورم الحليمي البشري العالي الخطورة والتعبير المناعي في محور البروتينات (بي 53 والرتينوبلاستوما) في المرضى السودانيين المصابين بأفات الفم. وقد بحثت عن وجود فيروس الورم الحليمي البشري العالي الخطورة في 200 مريض مصابين بأفات الفم تتراوح أعمارهم بين 14-85 عاما بمتوسط قدره 43 عام، (100 مريض مصاب بسرطان الفم 100 مريض المتبقي مصاب بالأفات الفموية غير الورمية). تم استخراج الحامض النووي الريبوسي من عينات الأنسجة، ثم تم التحقق عن وجود فيروس الورم الحليمي البشري العالي الخطورة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، ووجود طفرات الجينات الكابتة للورم بطريقة كيمياء الأنسجة المناعية. من 200 مريض، تم العثور على 200/12 (6%) مصاب بفيروس الورم الحليمي البشري العالي الخطورة، منها 12/10 (83.3%) مريض بسرطان الفم والباقي 12/2 (16.7%) مريض بالأفات الحميدة. من 12 نوع فيروس الورم الحليمي البشري: 12/6 (50%) من نوع 16، 12/4 (34%) من النوع 18، 12/1 (8%) من النوع 33. كانت ترددات المرضى الذين يعانون من سرطان الفم تتزايد مع زيادة العمر، اما الأفات الفموية الحميدة ترددات أعمارهم كانت تتناقص مع زيادة العمر، وكانت نسبة الذكور إلى الإناث 1:3. كل من الإناث والذكور لديها توزيع مماثل نسبيا بين الأفات الحميدة. ومع ذلك، كانت الأفات الخبيثة أكثر بين الذكور مقارنة مع الإناث. التعبير المناعي للطفرات بي 53 والرتينوبلاستوما تم التعرف عليها في 34 و 25 مريضا بسرطان الفم على التوالي. لا توجد طفرات جينية في المرضى بأفات حميدة، وبالنسبة لفيروس الورم الحليمي البشري من بين 34، وجدت 3 طفرات للبي 53، ومن بين 25 وجدت طفرة واحدة للرتينوبلاستوما. كان الفرق ذا دلالة إحصائية بين فيروس الورم الحليمي البشري وسرطان الفم الحرشفي، وكذلك الطفرات في بي 53 والرتينوبلاستوما ( $P.value: < 0.05$ ). ليس هنالك إي ارتباط ذا دلالة إحصائية بين عدوى فيروس الورم الحليمي البشري وطفرات الجينات الكابتة للورم (بي 53، الرتينوبلاستوما). وفي الختام فيروس الورم الحليمي البشري هو عامل خطر لحدوث سرطان الفم، والتي ينبغي النظر في استراتيجية الوقاية من سرطان الفم في السودان. اقترح مزيد من الحقائق العلمية في طفرات الجينات بي 53 والرتينوبلاستوما التي تلعب دورا حاسما في تطوير سرطانات الفم في السودان والتي تتطلب مزيدا من التحقيق في هذا السياق.

## Abstract

This is a descriptive Cross-sectional study conducted in Khartoum state during the period January 2012- January 2015. The study was aiming at assessing the association of high risk Human Papilloma Virus (HPV) with Immune expression of mutated p53 and Rb proteins among Sudanese patients with Oral Lesions. The presence of HRHPV was investigated in 200 patients with oral lesions their ages ranging from 14 to 85 years with a mean of 43 year, (100 were patients with oral cancer and remaining 100 patients with non-neoplastic oral lesions). DNA materials were extracted from tissue sample, then were investigated for the presence of HRHPV by Polymerase Chain Reaction (PCR), and the presence of tumor suppressor genes mutations by Immunohistochemical method. Out of the 200 patients, 12/200(6%) were found with HR-HPV infection of which, 10/12 (83.3%) were among oral cancer and the remaining 2/12 (16.7%) among benign group. Of the 12 HPV types: 6/12(50%) HPV16, 4/12(34%) HPV18, 1/12(8%) HPV31 and 1/12(8%) HPV33. The frequencies of patients with oral cancer were increasing with the increase of age. Hence, those with benign oral lesions. The frequencies of ages of patients were decreasing with the increase of age. Males to female's ratio was 1.38:1.0. Both females and males have a relatively similar distribution amongst benign lesions; however, malignant lesions were more frequently seen among males compared to females. For immune expression of P53 and Rb were identified in 34 and 25 patients of oral cancer. No mutations found in benign lesions, and the relation to HPV, out of 34, 3 positive p53 mutation, out of 25 only one positive Rb mutation. The association of HR-HPV with oral squamous cell carcinoma shown

statistically significant difference, as well as p53 and Rb mutations (P.value: <0.05). There is no statistically significant association between HPV infection and tumor suppressor genes mutations in oral cancer. In conclusion HPV is risk factor for occurrence oral cancer, which should be considered in prevention strategy in oral cancer in Sudan. The existing scientific finding suggested p53 and Rb mutations may play a role in the development of oral cancers in Sudan which require further investigation in this context.

## List of Contents

<b>Dedication</b>	I
<b>Acknowledgement</b>	II
ملخص الدراسة	III
<b>Abstract</b>	IV
<b>List of content</b>	VI
<b>List of Tables</b>	X
<b>List of Figures</b>	XI
<b>List of Photomicrograph</b>	XII

## Chapter One

<b>1- Introduction</b>	1
1.2 Rational.....	6
1.3 Objectives.....	6

## Chapter Two

### 2. Review of literature

2.1. Oral cavity.....	8
2.2. Inflammatory and infectious the oral cavity.....	10
2.2.1. Bacterial Infections.....	10
2.2.2. Fungal Infections.....	11
2.2.3. Viral Infections .....	11

2.3. Benign lesions of the oral cavity.....	12
2.3.1. Pyogenic Granuloma.....	12
2.3.2. Palatal and Mandibular Tori.....	12
2.3.3. Haemangioma .....	12
2.3.4. Lymphangioma.....	13
2.3.5. Mucocele .....	13
2.3.6. Fibroma.....	14
2.3.7. Leukoplakia and Erythroplakia.....	14
2.4. Oral cancer	14
2.4.1. Epidemiology of oral cancer.....	14
2.4.2. Etiology and risk factors of oral cancer.....	15
2.4.2.1. Tobacco Smoking.....	16
2.4.2.2. Smokeless Tobacco.....	16
2.4.2.3. Alcohol Use and Tobacco Smoking.....	17
2.4.2.4. Betel Quid Chewing.....	17
2.4.2.5. Oral Hygiene.....	17
2.4.2.6. Diet.....	18
2.4.2.7. Genetic and Familial Factors.....	18
2.4.2.8. Human Papilloma Virus.....	19
2.4.2.8.1. The HPV Structure and Genome.....	19
2.4.2.8.2. HPV Oncogenes and their interaction.....	20
2.4.2.8.3. HPV Life Cycle and Transmission.....	24

2.4.2.8.4. Mechanisms of HPV Mediated carcinogenesis....	25
2.4.2.8.5. Detection techniques of HPV in oral cancer.....	26
2.5. Diagnosis of oral cancer.....	31
2.5.1. Initial evaluation.....	31
2.5.2. Imaging studies.....	32
2.5.3. Magnetic resonance imaging (MRI).....	32
2.5.4. Oral brush biopsy.....	32
2.5.5. Exfoliative cytology.....	33
2.5.6. Cytomorphometry.....	33
2.5.7. Histopathology.....	33
2.5.8. Molecular methods.....	35
2.5.9. Immunohistochemistry.....	36
2.5.9.1. Tumor suppressor genes.....	37
2.5.9.1.1. P53.....	37
2.5.9.1.2. The Rb protein.....	38
2.6. Management of oral cancer.....	38
2.7. Prognosis of oral cancer.....	40

## Chapter Three

<b>3. Material and Methods</b>	<b>41</b>
3.1 Study design.....	41
3.2. Materials.....	41



3.3. Sample size.....	41
3.4. Sample processing.....	42
3.4.1. Immunohistochemistry.....	42
3.4.2. Molecular method.....	43
3.5. Statistical analysis.....	46
3.6. Ethical consideration.....	47

## Chapter Four

<b>4. Results.....</b>	<b>48</b>
------------------------	-----------

## Chapter Five

<b>5. Discussion.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Conclusions .....</b>	<b>68</b>
<b>5.2. Recommendation .....</b>	<b>69</b>

## Chapter Six

<b>6. References .....</b>	<b>70</b>
<b>7- Appendix.....</b>	<b>93</b>

## List of Tables

<b>Title</b>	<b>Page</b>
1.2. Staging of oral Cancer.....	35
3.1. Showing PCR Program used for amplification of HPV genes.....	45
3.2. Sequences of type-specific PCR primers used in this study.....	46
4.1. Distribution of study population by age and gender.....	51
4.2. Distribution of tumor, age, gender and site of oral lesion by HPV genotyping.....	52
4.3. Distribution of mutation of P53 and Rb by behavior .....	53
4.4. Correlation of mutation in tumor suppressor genes (p53,Rb) and oral lesion with HPV infection.	54

# List of Figures

<b>Figure</b>	<b>Page No</b>
4.1. Showing description of the study population by age.....	55
4.2. Showing description of oral lesions according to residence of study population.	56
4.3. Showing description of the study population by oral lesions and gender.....	57
4.4. Showing description of study population by lesion sites and tumor type.....	58
4.5. Showing description of study population by lesion sites and gender.....	59
4.6. Showing PCR amplification of HPV in oral lesions samples.....	60

## List of Photomicrograph

Photo	Page No
1- OSCC: P53 mutation Immunohistochemical staining: Strong positive	61
2- OSCC: Rb mutation Immunohistochemical staining: positive	62