DEDICATION

I dedicate this work

I would be very grateful if anybody can help me in writing the dedication of my thesis , I would like to dedicate it to my Mother and my Father but my Mother is dead so how can I say it …
Who offers me the inspiration of success and keenness throughout my life…

To my lovely family…… My wife and my Daughters…

Who always encourage me with passion and endless support. I am so Lucky to have a woman Love me so much and stand beside me the way you have!

To my faithful brothers and sisters…

Who have always helped me and believed that I could do it…

To My Supervisor Prof. Hussain Gad Elkarim Ahmed…

Who spare nothing towards my success …

ACKNOWLEDGEMENTS

"I am obliged to all those patients who were a part of this dissertation"

Initial thanks go to “THE GOD” for giving me an opportunity to do my post graduation. Certainly, this is my long awaited opportunity to express my gratitude towards all you wonderful people who have, in one way or another, supported me in my work with this thesis. In particular I would like to express my sincere gratitude to the following people: First of all I would like to express my highly grateful to my supervisor Prof. Hussain Gad Elkarim Ahmed for allowing me to do research work under their guidance, patience, support and inspiration, collaboration and friendship in research over several years. He introduced me to the world of research and sharing his immense knowledge in the field, for the enormous amount of work, time, energy and support. He has put in along with his heavy and administrative responsibilities and for his resolve and inspiring attitude that most things can be solved. I was impressed by your never ending energy and blessed by your keenness towards your students.

This dissertation would not have been possible without the guidance and the help of Dr. Mohammed Siddig A. A.ziz, my Co-supervisor and the dean of the College of medical laboratory sciences for his untiring effort in encouraging the teaching staff to pursue professional growth.

I would like to extend special thanks to Dr. Mohamed AL-Khatim Alsammani, for providing me the moral support and encouragement throughout the work period.

I would like to express my very great appreciation to my colleagues in the department of histopathology-Faculty of Medical laboratory sciences Sudan University of Sciences and Technology, Dr. Hassan Siddig, Dr. Abu Alqasim Abbass, Dr. Muneera, Dr. Tariq and Mr. Sharafaddeen. Your enlightening suggestions, helping and encouragements made me feel I was not isolated in my research.

I am particularly grateful for the assistance given by; Dr. Saad Alnoor Abusail, Dr. Arshad Rahmani, Dr. Ahmed Omer Almobarak, Dr. Mohamed Omer Yousif, Dr. Mohamed Omer Jamea, Dr. Mohamed Issa, Dr. Mohamed Ahmed, Dr. Magzoob Abbass, MR. Faris Mirghani, Mrs. Nada Salih and Mrs. Sarah Salih.

My sincere thanks also goes to Dr. Mohamed Alzuhairy, The Vice dean of the College of applied medical sciences Qassim University - Kingdom of Saudi Arabia, for providing space and facilities for carrying out the bench work in the research Lab.

I would like to thank the following hospitals for their assistance with the collection of my data: North Khartoum hospital, Omdurman Hospital, Military Hospital and Police Hospital.

I also take this opportunity to thank my family, specially my wife and my beloved children Raneem and Ragad. Of course, my deepest thanks to my friend outside work; and to all of you that I did not mentioning particular.

List of Contents

List of Tables:

List of Figures:

List of Abbreviations

ABs	Antibodies
bp	Base pair
CK19	Cytokeratin 19
CA	Cytoplasmic Area
CD	Cytoplasmic diameter
CI	Confidence interval
CM	Centimeter
CT	Computed Tomography
CMV	Cytomegalovirus
DAB	Diaminobenzidine
DW	Distilled water
DPX	Disterne Plasticizer Xylene
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein- barr virus
FFPW	Formalin- fixed, paraffin- wax
FNA	Fine needle aspiration
FNAB	Fine needle aspiration biopsy
FISH	Fluorescence in situ hybridization
HC II	Hybrid capture II
HR-HPV	High Risk-Human Papillomaviruses
HIV	Human immunodeficiency virus
HNSCC	Head and Neck squamous cell carcinoma

HPV	Human Papillomaviruses
HSV	Herpes Simplex virus
IARC	International agency for research on cancer
IHC	Immunohistochemical
ISH	In Situ hybridization
LR-HPV	Low Risk-Human Papillomaviruses
µL	Micro-Liter
mL	Mili-Liter
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	Massenger ribonucleic acid
NA	Nuclear Area
NA/CA	Nucleus-to-cytoplasm area ratio
NCR	Non-coding region
OCs	Oral cancers
OPLs	Oral premalignant lesions
OPSCCs	Oropharyngeal squamous cell carcinomas
OR	Odds Ratio
ORFS	Open- reading frame sequence
OSCCs	Oral squamous Cell Carcinomas
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
SGT	Salivary gland tumor
SPSS	Statistic Package for Social Sciences

TSN	Toombak use Tobacco Specific Nitrose amine
WHO	World Health Organization
VC	Verrucous carcinoma
VZV	Varicella zoster viru

Abstract

Background

High Risk human papillomaviruses (HR-HPV), subtypes are strongly linked to etiology of many human cancers including oral cancer. The epidemiology of infection with different HPV genotypes greatly varies in different countries. In Sudan, there are considerable numbers of oral cancers, most of them are attributed to the use of Tobacco (toombak) use and alcohol consumption is the main risk factors for oral cancers (OCs). Other risk factor includes the viral infection, particularly with Human papilloma virus (HPV).

Aim

The aim of this study was to identify and genotype the HR-HPV subtypes in oral tissues obtained from Khartoum State with oral lesions.

Material and methods

This is a prospective analytical case control study conducted at Khartoum State during the period from June 2010 to December 2013. Two hundred tissue blocks were retrieved from different histopathology laboratories in Khartoum State. Of the 200 formalin fixed paraffin wax processed tissue blocks, 100 were obtained from patients diagnosed with oral cancer and 100 samples were obtained from patients diagnosed with non-neoplastic lesions. Infection with HPV was initially determined using $p16^{INK4A}$ as a biomarker immunohistochemistry (IHC) method, and then genotyping was subsequently assessed applying polymerase chain reaction (PCR). Tumor DNA was amplified using PCR with HR-HPV consensus and multiplex primers. Cytokeratin 19 (CK19) antibodies was used to study the expression pattern in normal mucosa, dysplasias, and oral squamous cell carcinomas (OSCC), using IHC.

Results

HPV genomic materials using A6 and A7 primers were detected in 12/200 (6%) of oral lesions. Of these, 6/12 (50%) HPV-16, 4/12 (34%) HPV-18, 1/12 (8%) HPV-31, and 1/12(8%) HPV-33. Out of the 12 HPV; 8/12(66.7%) HPV were found in malignant lesions, whereas, 4/12(33.3%) HPV were found in benign lesions. Consequently, the risk associated with HPV infection was found to be statistically significant ($P<0.001$).

The age group 40-49 years was the most susceptible to HPV infection. According to relation between HPV and lesion sites, the most affected sites were buccal mucosa and oropharynx, particularly, SCCs, hence, most of benign lesions were seen in the salivary glands. The detected HR-HPV were type 16, 18, 31 and 33. The total number of cases detected by the PCR HPV genotyping were 12 cases, out of these 11(91.7%), were detected by p16, Statistically, P16 was significantly associated with HPV the ($P<0.005$).

Conclusion

In conclusion, the findings of this study provide strong association between HPV and OCs, amongst Sudanese patients. HPV particularly subtypes 16 and 18 play a role in the etiology of oral cancer in the Sudan. On the other hand, in this study P16INK4A immunostaining was used to screen tissue samples obtained from patients with oral lesions to indicate the presence of HPV infection. But the exact role of CK19 in the genesis of HPV requires further assessment.

□□□□□□

□□□□□□□:

ان فيروس الورم الحليمي البشري للسلالات الخطرة ، وهو السبب الرئيسي للعديد من السرطانات البشرية بما في ذلك سرطان الفم. انتشار وبائيات عدوى فيروس الورم الحليمي البشري يختلف اختلافا كبيرا في مختلف بلدان العالم حسب الأنماط الجينية. وفي السودان هنالك أعداد كبيرة من سرطانات الفم، وتنسب معظمها إلى استخدام التبغ (التمباك) وشرب الكحول وهي عوامل المسببة لسرطانات الفم. وتشمل عوامل خطر فيروسية أخرى، لا سيما فيروس الورم الحليمي البشري.

□□□□□:

هدفت هذه الدراسه الي كشف فيروس الورم الحليمي البشري للسلالات الخطرة بين المرضى المترددين بآفات الفم في ولاية الخرطوم.

□□□□□ □ □□□□□□:

الكشف عن هذا الفيروس باستخدام طريقتين هما تقنياتا الكشف المناعي النسيجي الكيميائي و طريقة الاحياء الجزيئيه. أجريت هذه الدراسة في ولاية الخرطوم خلال الفترة من يونيو 2010 إلى ديسمبر 2013. حيث تم اخذ 200 عينه نسيجيه من معامل الأنسجة المريضة المختلفة في ولاية الخرطوم، وقد تم الحصول على 100 عينة من المرضى الذين شخصت حالاتهم على انها سرطان الفم و 100 عينة من المرضى الذين شخصت حالاتهم بغير سرطانية. تم الكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري مبدئيا بطريقة كيمياء الانسجه المناعيه و ذلك باستخدام جسم مضاد خاص في شرائح محضره بطريقة شمع البرافين من ($p16^{INK4A}$) لهذا الفيروس يعرف بال انسجه سرطانات الفم ثم لاحقا تم تحديد انواع هذا الفيروس بالكشف عن الحمض النووى الخاص بهذه الانواع و ذلك عن طريق استخدام تفاعل سلاسلات انزيم البولمريز. ثم تم تضخيم الحمض النووي الخاص بهذه الانواع باستخدام بادئه خاصه لانواع ذات خطوره عاليه من هذا الفيروس باستخدام طريقة تفاعل سلاسلات انزيم البولمريز. كذلك تم الكشف عن انواع معينه من واسمات السرطان مثل سرطانات للأجـ (CK19) الفم للخلايا الحرشفية باستخدام الكشف المناعي النسيجي الكيميائي سام المضادة ايضا لدراسة نمط التغبير في الغشاء المخاطي.

النتائج:

تم الكشف عن فيروس الورم الحليمي البشري الجيني باستخدام طريقة الاحياء الجزيئيه عن الحمض النووى الخاص بهذه الانواع و ذلك عن طريق استخدام تفاعل سلاسلات انزيم البولمريز ، حيث تم تحديد 12/200 (6%) من الآفات الفموية، مقسمة على النواع الفرعية كالآتي 6/12 من فيروس الورم الحليمي البشري رقم 16 (50%)، 4/12 من فيروس الورم الحليمي البشري رقم 18 (34%)، من 1/12 فيروس الورم الحليمي البشري رقم 31 (8%) واخيرا 1/12 من فيروس الورم الحليمي البشري رقم 33 (8%). وايضا اظهرت النتائج على ان 8/12 (66.7) من فيروس الورم الحليمي البشري في الآفات الخبيثة ، في حين تم العثور على 4/12 (

33.3 ٪) من فيروس الورم الحليمي البشري في آفات الغير سرطانية لتكون ذات دلالة إحصائية (P<0.005).

كـانت الفئة العمريـة 40-49 سنة الأكثر عرضة للإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري . وفقا للعلاقة بين فيروس الـورم الحليمـي البشـري و مواقـع الآفـات ، حيـث كانت المواقع الأكثر تضررا تجاويف الفم و البلعوم و معظـم الآفـات الغيـر سـرطانية في الغدد اللعابية. كان إجمالي عدد الحالات المكتشفة للحمض النـووى الخـاص بهـذه الانـواع و ذلـك عـن طريـق اسـتخدام تفاعـل سلاسـلات انزيـم البـولمريز. حيـث كـان فيروس الورم الحليمي البشري 12 حالة ، من هذه 12 من هذه 11 منها كانت موجبة مـن الكشـف ($p16^{INK4A}$) باسـتخدام جسـم مضـاد خـاص لهـذا الفيـروس يعـرف بـال المناعي النسيجي الكيميائي.

□□□□□□□:

تعطي نتائج هذه الدراسه دليل مقنع بوجود إرتباط قوي بين فيـروس الـورم الحليمـي البشـري و سـرطانات الفـم فـي المرضـى السـودانيين بـالاخص تلـك الـتي تنشـأ فـي منطقة تجويف الفم, البلعوم و المـرئ. وان فيـروس الـورم الحليمـي البشـري خاصـة أنواعه فرعية 16 و 18 تلعب دورا كبيرا في حدوث سرطانات الفم في السودان. من المناعيـة لفحـص عينـات الأنسـجة P16 ناحية أخرى ، في هذه الدراسة تم اسـتخدام مناعيا كيميائيا حيث يمكـن اسـتخدام هـذا المضـاد المنـاعي كمؤشـر لوجـود فيـروس الـورم الحليمـي البشـري مـن المرضـى الـذين يعـانون مـن آفـات الفـم. ولكـن الـدور في نشأة فيروس الـورم الحليمـي البشـري يحتـاج إلـى مزيـد مـن CK19 الدقيق لل الدراسات.