الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية طب الأسنان
قسم طب الفم

تقييم مستويات الدنا المتقدري في اللعاب لدى مرضى الآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة كواصم حيوي غير باضع

Evalution of mitochondrial DNA levels in saliva of oral malignant and potential malignant lesions as non-invasive biomarker

أُطروحة قُدّمت إلى جامعة دِمشق لنيل دَرجة الماجِستير باختصاص طِبّ الفَم

إعداد: لنا سيّال

الأستاذ المشرف

الأستاذ الدكتور عمار مشلح
رئيس قسم طب الفم
كلية طب الأسنان- جامعة دمشق

الأستاذ المشرف المشارك

الأستاذ الدكتور عصام قاسم
أستاذ الوراثة
مدير مركز التقانات الحيوية

1435 هـ - 2015 م

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية طب الأسنان
قسم طب الفم

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

Evalution of mitochondrial DNA levels in saliva of oral malignant and potential malignant patients as non-invasive biomarker

A dissertation submitted to Damascus University to get the Master degree in Oral Medicine

Prepared by: lana sayall

Supervisor
Ammar Mashlah
Head of Oral Medicine Department
Faculty of Dentistry
Damascus University

Co-supervisor
Issam kassem
Professor in genetic
The Director of National commission
Of Biotechnology

1435 Hijri- 2015

بسم الله الرحمن الرحيم

بسم الله الرحمن الرحيم

"قُلْ هَلْ عِنْدَكُمْ مِنْ عِلْمٍ
فَتُخْرِجُوهُ لَنَا"

الأنعام-148

صُورَة مِن قَرار تَشْكِيل لَجْنَة الحكم

الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم /١١١٣/ المنعقد
بالجلسة رقم /١١/ تاريخ ٢٠١٥/٢/٩

اطلع مجلس البحث العلمي والدراسات العليا على قرار مجلس كلية طب الأسنان رقم /٢٢٨/ تاريخ ٢٠١٥/٢/٣

وبعد الرجوع إلى اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم /٢٥٠/ لعام ٢٠٠٦ .

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /١٧٥٤/ص.م تاريخ ٢٠١٣/٤/٨ بشأن الموافقة على تسجيل رسالة الطالبة

وبنتيجة المذاكرة قرر مجلس البحث العلمي والدراسات العليا :

الموافقة على تأليف لجنة الحكم على رسالة الماجستير في قسم طب الفم التي أعدتها الطالبة لنا سيال بعنوان : ((تقييم مستويات الدنا المتقدري في اللعاب لدى مرضى الآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة كواصم حيوي غير باضع)) بكلية طب الأسنان من السادة الأساتذة :

د. عمار مشلح	الأستاذ في قسم طب الفم	كلية طب الأسنان
جامعة دمشق	الاختصاص: طب الفم	عضواً مشرفاً
د. عمر حمادة	المدرس في قسم طب الفم	كلية طب الأسنان
جامعة دمشق	الاختصاص : طب الفم	عضواً
د. ريم ندرة	المدرس في قسم علوم الحياة	كلية طب الأسنان
جامعة دمشق	الاختصاص: بيولوجيا الفم الجزيئية	عضواً

وذلك وفق ما هو وارد في قرار مجلس الكلية آنف الذكر،،،

ملاحظة: يرجى إرسال نسخة عن الإعلان الخاص بتحديد موعد المناقشة فور صدوره إلى مكتب نائب رئيس الجامعة لشؤون البحث العلمي والدراسات العليا.

تصريح

" لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم أخذه بالكامل من عمل آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في هذه الجامعة أو في أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي ".

الإهداء

إلى يمننا السعيد بلد الحكمة والأصالة والعروبة
وطني الغالي الجمهورية اليمنية...
إلى بلد الجمال، إلى بلد التاريخ العربي
الأصيل إلى البلد الذي احتواني رغم المحن،
سوريتي الحبيبة...
إلى من تمنيت أن يشاركني هذه اللحظة، إلى
من علمني معنى الحب والعطاء المرحوم
والدي العزيز...
إلى الشمعة التي أنارت لي طريقي، أهديك
سلاماً لو رفع إلى السماء لكان قراً منيراً ولو
نزل إلى الارض لكساها سندساً وحريراً.. أمي
الغالية..
إلى أميرات قلبي أخواتي ليندا وريتا..إلى
القناديل التي زينت بيتنا روان وروى ورنا
وريتال...إلى اخي الذي لم تلده امي نجيب
محفوظ..

إلى من قضيت معهن أجمل أيام حياتي
صديقاتي في سكن الدراسات ملدا ماني، رنا
الحسيني، كوثر الشيبي، جومانا المحمود، سندس
حسينو، رفاه الحمني، سماح مبارك، نور
عبد الرزاق، حنين الكيال، أدى فرحات، نور
شمس الدين، عبير كول علي، عبير الأسدي،
سمر سلامة، إلى من رافقوني الخطوات الأولى
لإنجاز هذا البحث الدكتورة رفاه جبال د
رزان حافظ والمهندسة بنان الشيخ.

كَلِمَةُ شُكْرٍ

الحمد لله الموفق والمعين الذي أسبغ علي من عطائه وأسبل علي من نعمه، وأيدني بأناس كثير أخص منهم بالشكر الجزيل.....

أستاذي و مشرفي العزيز

الأستاذ الدكتور عمار مشلح

الذي لم يبخل عليَّ بتوجيهاته ونصحه ورعايته خلال سنوات دراستي، وأقدر جليًا متابعته الحثيثة لي أولاً بأول خلال السنوات التي قضيتها في القسم، وكل الشكر له على بصماته الواضحة في جميع ثنايا هذه الأطروحة.....

وأجل تقديري وامتناني لأستاذي القدير للمشرف المشارك

الأستاذ الدكتور عصام قاسم

مدير مركز التقانات الحيوية الذي لم يبخل علي بوقته وجهدة –رغم مشاغله -ليضفي على هذه الأطروحة من نفحاته العلمية الرائعة.....

وأقف إجلالاً واحترامًا أمام الصرح العلمي الشامخ

جامعة دمشـــق

تلك المنارة العلمية الشامخة والصامدة رغم كل الصعاب والظروف وبإذن الله سيبقى بريقها العلمي أخّاذًا.....

وأتوجه بالشكر والتقدير والعرفان إلى

كلية طب الأسنان بجامعة دمشق

ممثلة **بالأستاذة الدكتورة رزان خطاب** عميدة الكلية و**الأستاذ الدكتور إياد الشعراني** نائب العميد للشؤون العلمية و**الأستاذ الدكتور ياسر المدلل** نائب العميد للشؤون الإدارية والشكر موصول كذلك لجميع أساتذة وإداريي الكلية... وأخص بالذكر أستاذي العزيز حسين ابو حامد و أساتذتي الكرام

في قسم طب الفم.....

وأتقدم بالشكر والتقدير للأساتذة أعضاء لجنة الحكم كما يشرفني قبلوهم التحكيم لهذه الرسالة ...
ا.د عمر حمادة نائب عميد المعهد العالي لبحوث الليزر و تطبيقاته.
ا.د ريم ندرة اخصائية بيولوجيا الفم الجزيئية في قسم علوم الحياه.

وأتوجه بالشكر الجزيل للأستاذة **فوزة منعم**

رئيسة المخبر في مشفى الأسد الجامعي

كما أتوجه بالشكر الجزيل للدكتورة **وفاء حبال**

مشرفة وحدة البيولوجيا الجزيئية في مستشفى الاسد الجامعي

لمساعدتها الهائلة لي في الجانب العملي وتحليل النتائج وقد بدت لمساتها واضحة...

وأتوجه بالشكر الجزيل والعميق إلى

د. رمزي مرشد رئيس قسم التقانات الحيوية **و د. معتز الخن** رئيس قسم جراحة الوجه والفكين مستشفى المجتهد

لمساعدتهم لي في الجانب العملي لهم مني كل الاحترام التقدير...

وختاماً أتوجه إلى **طلاب الدراسات العليا الذين ساندوني بشكل واضح في الجانب العملي للرسالة ومنهم طلاب مستشفى المجتهد وأخص منهم د.سامي ابراهيم ود.محمد عواد وطالبة الدراسات العليا في كلية الصيدلة ملدا صآفي، وطلاب الدراسات العليا كلية طب الاسنان عماد برنجكجي و رزان حافظ ، بثينة سلامة ومنار مخول الهيئة العامة للتقانة الحيوية**.. الذين كانوا في الحقيقة سبباً للدراسة والقراءة والاستزادة ..... لقد تعلمت منهم الكثير فلهم مني جزيل الشكر وتمنياتي لهم بالتوفيق.....

Contents

قائمة المحتويات

قائمة المحتويـــــات	**1**
قائمة الجـــــداول	**3**
قائمة الأشكـــــال	**8**
قائمة الاختصارات	**10**
المقدمة	**12**
هـدف البحـــــث	**15**
الباب الأول: المراجعة النظرية	**16**
1-1. لمحة تشريحية عن الحفرة الفموية	17
1-2. سرطان شائك الخلايا(سرطان الفم)	17
1-3. الاضطرابات الفموية محتملة الخباثة	22
1-4. تشخيص سرطان الفم ووالاضطرابات محتملة الخباثة	25
1-5. الخلية (لمحة تشريحية)	35
1-5-2. النواه	36
1-5-3. المتقدرات	37
1-5-4. D-loop	44
1-5-5. المتقدرات والسرطان	45
الباب الثاني: المواد والطرائق	**50**
2-1. عينة البحث	51
2-2. مواد البحث	53
2-3. طرائق الدراسة	57
2-4. اختبار العينات	79
2-5. التحليل الإحصائي	79
الباب الثالث: النتائج	**81**
3-1. وصف العينة	82
3-2. الدراسة الإحصائية التحليلية	84
3-3. دراسة المتغيرات المتعلقة بالدنا في اللعاب في عينة البحث	88
الباب الرابع: المناقشة	**105**
4-1. المناقشة	106
4-1-1. قصور/ محدودية الدراسة	107

Contents

قائمة المحتويات

4-1-2. مميزات الدراسة	108
4-1-3. مناقشة النتائج	111
الباب الخامس: الاستنتاجات	**114**
الباب السادس: المقترحات والتوصيات	**116**
6-1. المقترحات	117
6-2. التوصيات	118
الباب السابع: المراجع	**119**
الملخص	**A**
الملاحق	**D**

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوانه
الجدول 2-1	العتائد المستخدمة في البحث.
الجدول 2-2	المواد الكيميائية المستخدمة في البحث.
الجدول 2-3	الأدوات المستخدمة في البحث.
الجدول 2-4	الأجهزة المستخدمة في البحث.
الجدول 2-5	البرمجيات المستخدمة في البحث.
الجدول 2-6	التسلسل النوكليوتيدي للمشارع والمسابر المستخدمة في البحث.
الجدول 2-7	كمية مواد التفاعل وتراكيزها.
الجدول 2-8	برنامج الدورات الحرارية المتبع لتفاعل PCR.
الجدول 2-9	ناتج قياس جهاز Nanodrp لعياري كل من nDNA و mDNA .
الجدول 2-10	عدد النسخ/ ميكروليتر لعياري كل من nDNA و mDNA.
الجدول 2-11	سلسلة تمديدات العياري serial dilution لكل من الدنا المتقدري والدنا النووي.
الجدول 2-12	قيم درجة حرارة التلدين التي تمَّ اختبارها.
الجدول 2-13	تراكيز متعددة للبادئات التي تمَّ اختبارها.
الجدول 2-14	تراكيز متعددة للمسابير التي تمَّ اختبارها.
الجدول 2-15	اعتماد الشروط المثلى لكافة المعالم.
الجدول 3-1	توزع عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول 3-2	توزع عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة.
الجدول 3-3	الحد الادنى والحد الاعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لأعمار المرضى بالسنوات في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول 3-4	نتائج الاستقصاء عن عادة التدخين.
الجدول 3-5	الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لمدة التدخين بالسنوات وفقاً للمجموعة المدروسة.

List of tables

قائمة الجداول

الجدول 3-6	الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لعدد السجائر المتناولة يومياًفي مجموعة المدخنين وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول 3-7	الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والا نحراف المعياري لمدة الاصابة بالآفة الفموية بالاشهر.
الجدول 3-8	نتائج الاستقصاء عن توضع الآفه في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول 3-9	نتائج الاستقصاء عن درجة الاصابة بالآفة الفموية في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة.
الجدول 3-10	نتائج الاستقصاء عن درجة التصنيف النسيجي للطلاوة في مجموعة المصابين بالآفات محتملة الخباثة.
الجدول 3-11	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطاء المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي ونسبة التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي/ لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي .
الجدول 3-12	نتائج اختبار تحليل التباين احادي الجانب Anova لدراسة الفروق بين متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي ونسبة التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي/ لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي .
الجدول 3-13	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة.
الجدول 3-14	نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

الجدول 3-15	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريض (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول 3-16	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لعادة التدخين والمجموعة المدروسة.
الجدول 3-17	نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول3-18	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين عدد السجائر المتناولة يومياً وقيم كل و لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.
الجدول3-19	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مدة التدخين (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

الجدول 3-20	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المرضى من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة
الجدول 3-21	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين درجة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث.
الجدول 3-22	المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث وفقاً لنوع الطلاوة.
الجدول 3-23	نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة المصابين بسوء تصنّع ومجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث

الجدول 3-24	نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين درجة الإصابة النسيجية بالآفة الفموية محتملة الخباثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث، وذلك وفقاً للتصنيف النسيجي للطلاوة

List of Figures

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوانه
1-1	نبات التنبول والفوفل.
2-1	الخلايا الورمية الجائلة في سوائل الجسم وانتشارها إلى الاعضاء.
3-1	مبداء التفاعل التسلسلي للبوليمراز.
4-1	تداخل طيف إصدار الصباغ المعطي مع طيف إثارة الصباغ المتلقي.
5-1	مبداء كشف ناتج التفاعل PCR بمسابر الحلمهة Tag Man Probes في نهاية مرحلة الإطالة.
6-1	المجين المتقدري.
1-2	مكونات طاقم عزل الدنا.
2-2	جهاز PCR والدورات الحرارية المتبعة لتحضير العياري.
3-2	جهاز مقياس درجة الحموضة.
4-2	حقن العينات في هلامة الآغاروز.
5-2	جهاز الرحلان الكهربائي.
6-2	حزمة الدنا وتظهر حزمة واحدة.
7-2	التسلسل الناتج عن الشذف المراد تضخيمها في الدنا النووي وتظهر 60 نوكليوتيد.
8-2	جهاز Nanodrop.
9-2	التسلسل النوكليوتيدي للقطعة المراد تضخيمها في الدنا النووي المتاح في NCBI.
10-2	واجهة برنامج DNA/RNA copy number calculator لحساب عياري المتقدرات.
11-2	التسلسل النوكليوتيدي للقطعة المراد تضخيمها في الدنا النووي.
12-2	واجهة برنامج DNA/RNA copy number calculator لحِساب عياري النواه.
13-2	طريقة تحضير سلسلة العياري.
14-2	عياري الدنا النووي والدنا المتقدري.
15-2	واجهة لجهاز Real –Time PCR توضح إختبار العينات و NTC.
1-3	النسبة المئوية لتوزع عينة البحث وفقاً للفئة العمرية.
2-3	نتائج استقصاء عن عادة تناول الكحوليات في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.
3-3	يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي/ لوغارتم التركيز الدنا النووي وفقاً للمجموعة المدروسة.

List of Figures

قائمة الأشكال

4-3	يمثل منحنى ROC قيم لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي والإصابة بالآفات الفموية محتملة الخباثة.
5-3	يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة.
6-3	يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لعادة التدخين والمجموعة المدروسة.

قائمة الاختصارات

الاختصار	مدلوله	ترجمته أو معناه
OSCC	Oral squamous cell carcinoma	سرطان شائك الخلايا
mDNA	Mitochondrial DNA	الدنا المتقدري
nDNA	Nuclear DNA	الدنا النووي
CTC	Circulating tumor cell	الخلايا الورمية الجائلة
Q-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction	المتابعة اللحظية لتفاعل البوليميراز التسلسلي
PCR	Polymerase Chain Reaction	سلسلة تفاعل البلمرة
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer	نقل رنين التألق للطاقة
BCL_2	B-Cell Lymphoma 2	الخلايا اللمفاوية البيضاء 2
BAX	Bcl-2 associated x protein	الخلايا اللمفاوية البيضاء مرتبطة ببروتين x
BH3	BCL-2 Homology domain 3	-
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1	عامل 1 المفعل لأنزيم البروتياز الخاص بالموت الخلوي المبرمج
D-LOOP	Displacement- loop	العروة المنزاحة
HIF1	Hypoxia inducible factor 1	عامل نقص الاكسدة 1
ATP	Adenosine Triphosphate	أدينوسين ثلاثي فوسفات
PDH	Pyruvate dehydrogenase	بيروفات دهيدروجيناز
LDH	Lactate dehydrogenase	لاكتات دهيدروجيناز
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	بيروفات دهيدروجيناز كيناز 1
RAS	RAT Sarcoma	-
MYC	myelocytomatosis	-

Abbreviations list

قائمة الاختصارات

MDM2	Mouse double minute 2 homolog	بروتين يرمز بواسطة جينة MDM2
RB	Retinoblastoma	بروتين مثبط للورم
COX	Cytochrome c oxidase	أكسيداز السيتوكروم c
SCO2	Cytochrome c oxidase 2	بروتين يرمز لجين SCO2
ROS	Reactive oxygen spices	الجذور الاوكسجينيه الحرة
SDHB	one of four protein subunits forming succinate dehydrogenase	احد البروتينات المكونة للسكسينات ديهيدروجيناز
SDHC	one of four protein subunits forming succinate dehydrogenase	احد البروتينات المكونة للسكسينات ديهيدروجيناز
SDHD	SDHB is one of four protein subunits forming succinate dehydrogenase	احد البروتينات المكونة للسكسينات ديهيدروجيناز

تمَّ إدخال مصطلح حقل التطور السرطاني Field cancerization عام 1953 من قبل العالِمَين Slaughter و Southwick، حيث تعرَّف نظرية التطور السرطاني الفموي تقليدياً بزيادة نسبة خطورة الإصابة بسرطانات السبيل الهوائي الهضمي بسبب تعرض الظهارة الفموية للعديد من العوامل المسرطنة مؤديةً إلى تراكم العديد من التغيرات المورثية في كلٍّ من المورثات الورمية والمورثات الكابحة للورم. وحين لا يتمكّن المريض من القضاء على العوامل المسرطنة وبالتالي إصلاح الدنا المتحطم تظهر لديه آفات سريرية محتملة الخباثة ذات تغيرات نسيجية تتراوح بين فرط تصنع إلى سوء تصنّع خفيف، وسوء تصنّع نسيجي وخيم، وسرطان موضع ينتهي بسرطان باضعNon- invasive .

يُعتبر السرطان شائك الخلايا هو الأكثر شيوعاً إذ يشكّل 90-96% من سرطانات الفم؛ ولهذا يتكرر استخدام مصطلح سرطان شائك الخلايا بديلاً عن مصطلح سرطان الفم. كما يصيب من تتراوح أعمارهم بين 40-60 عاماً، ويصيب من الذكور ضِعف الإناث. أمّا الآفات الفموية محتملة الخباثة فتضمّ الطلاوة البيضاء، والطلاوة الحمراء، والورم الليفي تحت المخاطي. ويعتبر اللسان أكثر المناطق عرضةً للإصابة (30-35%)، تليه اللثة (20-25%)، ثم قاع الفم (5-7%)، والحنك الرخو (4-6%)، والخد (2-3%).

يعتبر التدخين واستهلاك الكحول من الأسباب الرئيسية للإصابة بسرطان الرأس والعنق وذلك بنسبة تقدّر بـ 75% ؛ فهما يحويان مواد سامة تزيد تحطم الدنا، وأكسدة بعض البروتينات، وإنتاج الجذور الحرة. وبما أن المتقدرات هي المسؤولة عن السلسلة التنفسية، وإنتاج الجذور

الحرة، فهي الأكثر عرضةً للإصابة بالطفرات وبالتالي حدوث السرطانات؛ وهذا قد يؤدّي إلى تغيرات في محتوى الدنا وعدد نسخه.

يفيد الكشف المبكر لسرطان الفم في منع فقدان الوظيفة، والنكس، والوفاة، مع تحسين معدل الحياه بخلاف كشف المرض في مراحله المتقدّمة والذي يتم لدى 50% من المرضى. وتعتبر الخزعة التشخيصية المعيار الذهبي في تشخيص الآفات محتملة الخباثة والخبيثة، ولكن تمَّ الاعتماد حديثاً على تحليل الدنا لما يقدّمه من نتائج مبهرة ومؤكدة في الخزعات السائلة Liquid Biopsy التي يُستخلَص منها الخلايا الجائلة في الدم، والمصل، واللعاب، والنطاف، والبول، والسائل النخاعي الشوكي فهو يعايَر كلاً من الدنا المتقدري والنووي مما يجعله وسيلة تشخيصية غير باضعة(Non-invasive).

تمّ التوجه في العقد الأخير الى استخدام المتابعة اللحظية لتفاعل البوليميراز التسلسلي Real Time PCR التي تسمح بقياس كمي دقيق وحساس لتسلسل نوكليوتيدي محدد حتى وإن كانت تراكيزه المبدئية منخفضة، كما أنَّ له المقدرة على قياس أكثر من مورثة في التفاعل نفسه وتعتمد آلية العمل فيه على رصد التضخيم أوّلاً بأوّل باستخدام تقنية الفلورة .

هدف الدراسة

دوافع البحث ومسوغاته: Aims And Objective Of The Study

هدفت هذه الدراسة إلى تقييم وسائل تشخيصية غير راضّة بديلة عن الخزعة الجراحية لاكتشاف هذه الآفات في مراحل مبكرة للحد من العبء على الفرد والمجتمع، وذلك استناداً لما تناوله الأدب الطبي عن دور الخلايا الورمية الجائلة في أنواع عديدة من السرطانات، وذلك من خلال مقايسة الدنا النووي و المتقدري في الخلايا الجائلة في اللعاب عند مرضى سرطان شائك الخلايا والطلاوة البيضاء وحالات الشاهد، وتقييم علاقة المظاهر السريرية للآفات السرطانية وقبيل السرطانية بنتيجة التشريح المرضي ومدى ارتباطها بتغيرات عدد نسخ الدنا المتقدري/ الدنا النووي.

كان الهدف من هذه الدراسة هو:

1- دراسة التحري عن مدى الفروقات في قيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي وفقاً للمجموعات الثلاث.

2- دراسة تأثير جنس المريض في قيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي وفقاً للمجموعة المدروسة.

3- دراسة العلاقة بين قيم عمر المريض وقيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي وفقاً للمجموعة المدروسة.

4- دراسة تأثير عادة التدخين في قيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي وفقاً للمجموعة المدروسة.

5- دراسة العلاقة بين مستويات الدنا المتقدري/ الدنا النووي بمرحلة الورم.

6- دراسة العلاقة بين مستويات الدنا المتقدري/ الدنا النووي بالتصنيف النسيجي للطلاوة البيضاء.

الباب الأول

المراجعة النظرية

1-1.لمحة تشريحية عن الحفرة الفموية

لمحة تشريحية:

تشمل الحفرة الفموية الشفاه، والحنك الصلب، والناتئ السنخي العلوي والسفلي، والثلثين الأماميين للسان، والسطح السفلي للسان، والمخاطية الخدية، والمثلث خلف الرحوي، وقاع الفم (العضلة الضرسية اللامية، والعضلة ذات البطنين، والعضلة الذقنيّة اللامية) (Tshering Vogel et al. 2010). وتمتد الحدود العلوية للحفرة الفموية من الشفاه إلى منطقة اتصال الحنك الصلب بالحنك الرخو، وتشكل اللوزة الأمامية الحواف الجانبية بين الحفرة الفموية والبلعوم الفموي؛ وتشمل الحدود السفلية للحفرة الفموية العضلة الضرسية اللامية (Ravi V 2011). أما البلعوم الفموي فيتشكل من الجزء الخلفي للسان، واللوزة، واللهاة، والحنك الرخو، والجدار الجانبي والخلفي للبلعوم، وينتهي بالعظم اللامي (Tshering Vogel et al. 2010) ، (Lambert et al. 2011) .

1-2. تعريف سرطان الفم : Definition Of Oral Cancer

يُعتبر سرطان الرأس والعنق مصطلحاً موحداً لوصف الأورام الخبيثة في الجزء العلوي للسبيل الهوائي الهضمي الذي يشمل الحفرة الفموية، والبلعوم، والحنجرة (Dobrossy 2005)، ويشكل تعريف سرطان الفم والبلعوم الفموي تحدياً حقيقياً لأن حدود الحفرة الفموية غير محدّدة تشريحياً بدقة (Tapia & Goldberg 2011)،(Lambert et al. 2011). وذلك لاشتراكهما في القصة الطبية، والوبائيات، وعوامل الخطورة (Bhurgri et al. 2006). وقد صنفت منظمة الصحة العالمية نظامان معياريان لتحديد المواقع التشريحية والتشخيص النسيجي للأورام. حيث كان الاول هوالتصنيف العالمي للأمراض في نسخته العاشرة International Classification Of Diseases(ICD-10) والثاني التصنيف العالمي للأمراض الخاص بالأورام في نسخته الثالثة Inernational Classification of Dseases Oncology(ICD-0-3) (Hertrampf et al. 2012) (Lambert et al. 2011) ، (Dobrossy 2005)

وفقا لهذين المرجعين يدخل سرطان الشفاه والحفرة الفموية، والبلعوم في مجموعة واحدة ترمز بـC00-C14 (Bhurgri et al. 2006) يشكّل سرطان الفم الجزء الأكبر من سرطانات الرأس والعنق، ويشمل الشفاه، وقاعدة اللسان، واللسان، واللثة، وقاع الفم، والحنك، والبلعوم الذي بدورِهِ يشمل البلعوم الفموي، البلعوم السفلي، والبُلعوم الأنفيّ. إذ تقدّر نسبة حدوث سرطان الفم بـ 40% من سرطانات الرأس والعنق، و15% من سرطانات البلعوم، و25% من سرطانات الحنجرة، أما النسبة المتبقية فتشمل سرطانات الغدد اللعابية والنكفية (Dobrossy 2005).

1-2-1. أعراض سرطان الفم Symptoms

يشكو 30-40% من مرضى سرطان الفم من الألم (Linneu Cuffari & and Abrão Rapaport 2006) رغم أنّ مراحله الأولية خالية من الأعراض. لذلك ينشأ الألم والإحساس بالحرقة عندما يصل الورم الى مراحل متقدمة (van Zyl & Bunn 2012) (Markopoulos 2012) أو عندما يتلقى المريض تداخلاتٍ علاجية. وتتراوح الأعراض ما بين الشعور بعدم الارتياح إلى الألم الحادّ خصوصا في اللسان، إضافةً إلى ألم الأذن، والنزف، وحركة الأسنان، واضطراب التنفس، وصعوبة النطق (Bagan et al. 2010)، والضزز، والشعور بالنَّمَل، وتضخم العقد اللمفاوية في العنق (Bagan et al. 2010)، وعسر البلع لصعوبة حركة الفك السفلي واللسان (Jamie L Penner 2007). في المراحل المتأخرة من المرض قد ينشأ ناسور جلدي إضافة الى أعراض أخرى مثل النزف، وفقر الدم، والدنف (Bagan et al. 2010).

1-2-2. المظاهر السريرية:Clinical Manifestation

يأخذ السرطان شائك الخلايا العديد من الأشكال السريرية، ويعتمد ذلك على موقع الورم، ومدة الإصابة، وعوامل الخطورة، والاعتلالات محتملة الخباثة التي نشأ عنها (Nicolás Bolesina & Silvia A. López de Blanc 2012)؛ فالبعض ينشأ عن مخاطية سليمة تماماً، بينما ينشأ البعض عن آفات محتملة الخباثة (Markopoulos 2012) -كالطلاوة البيضاء، والطلاوة الحمراء، والطلاوة المبرقشة (البيضاء والحمراء)، والطلاوة الثؤلولية- يكون فيها السطح الخارجي متآكلاً دون أي أعراض. وتميل الآفات إلى الحفاظ على حجمها، ولا تستجيب للعلاج الموضعي، وقد يلاحظ تغيرات على سطحها الخارجي (Nicolás Bolesina & Silvia A. López de Blanc 2012).

قد توصف المظاهر السريرية لسرطان الفم بأنها ذات نمو داخلي Endophytic، وقرحة تنخرية حوافّها مرتفعة قاسية غير منتظمة. أما الآفات خارجية النمو Exophytic فتتصف بكتلة ذات قاعدة واسعة تتمتع بسطح حليمي قد يكون ثؤلولياً، ويتقرّح السطح غالباً مع إحساس بالتصلب حول الآفة.

يتراوح لون الآفة بين الطبيعي إلى الأحمر والأبيض (Liviu Feller 2012) (Raghu Radhakrishnan 2012). على سبيل المثال يظهر سرطان الشفاه غالباً نتيجة التعرض المزمن للأشعة فوق البنفسجية من ضوء الشمس (Treister 2010)، أو قد ينشأ موضعَ السيجارة عند الشفاه السفلية وذلك بنسبة 90% (Raghu Radhakrishnan 2012)، وحجمٍ

لا يتجاوز 1سم ينتشر سطحياً، وينتقل إلى العقد اللمفية تحت الذقنية وتحت الفك السفلي (S.PORTER 2002; Nicolás Bolesina & Silvia A. López de Blanc 2012).

أما سرطان اللسان فهو الأكثر شيوعاً بين سرطانات الحفرة الفموية، وغالباً يصيب الجزأين الجانبي الخلفي والبطني للسان (Treister 2010)، ويتظاهر باحمرار مع عقيدات أو قرحة عميقة تعيق حركة اللسان (Raghu Radhakrishnan 2012).

أمّا سرطان قاع الفم فيشكل 15–30% من سرطانات الحفرة الفموية، ويتظاهر كساحة حمراء أو بيضاء، أو قرحة صغيرة الحجم، أو آفة حليمية؛ و تظهر الآفة قاسية بالجس على أحد جانبي الخط المتوسط، وتحدث انتقالات ورمية إلى العقد اللمفية تحت الفك السفلي (Raghu Radhakrishnan 2012) و العقد اللمفية تحت الذقن، و العقد اللمفية تحت الفك العلوي، والعقد اللمفية العنقية (Nicolás Bolesina & Silvia A. López de Blanc 2012).

ينتشر سرطان قاع الفم سطحياً ثم عميقاً إلى أن يخترق العضلة الضرسية اللامية أو إلى الغدة تحت اللسان (Raghu Radhakrishnan 2012)،

أمّا سرطان المخاطية الخدية فيتصف بطلاوة بيضاء أو حمراء خاصة على الجزء الأمامي من المخاطية الخدية، وتعدّ صلابة المنطقة أولى العلامات ظهوراً، تليها كتلة خارجية النمو، تليها قرحة نادرة الحدوث. أمّا في سرطان الجزء الخلفي من المخاطية الخدية فيعتبر الإنذار سيئاً، إذ تنشأ كتلة داخلية النمو، أو قرحة (Nicolás Bolesina & Silvia A. López de Blanc 2012) ذات حواف صلبة بالجس، وفي مراحل متقدمة يرتشح إلى العظم والجلد في المنطقة، وتحدث انتقالات ورمية إلى العقد اللمفية تحت الفك العلوي (Raghu Radhakrishnan 2012).

أما في سرطان اللثة فتكون المنطقة متقرحة أو تظهر كتلة خارجية النمو حبيبية أو ثؤلولية. ينتشر السرطان في الفك العلوي إلى الجيب الفكي أو الحنك أو اللوزة، أما في الفك السفلي فينتشر إلى قاع الفم، أو بشكل جانبي إلى الخد، أو إلى العظم. أمّا سرطان الحنك فيكون ذا مظهر حليمي، أو تظهر كتلة خارجية النمو، وينتشر سطحياً إلى أن يمتد إلى البلعوم الفموي (Raghu Radhakrishnan 2012).

1-2-3. العوامل المؤهبة للإصابة بسرطان الفم:

1-2-3-1. التدخين:

اعتبرت الوكالة الدولية لأبحاث السرطان International Agency For Research On Cancer أن التدخين بأنواعه كافةً (بيديbidis، أو غليونpipe، أو سيجارcigar، أو سيجارةcigarette) يعتبر عاملاً مسرطناً (Mehrotra & Yadav 2006) (Park et al. 2014). ويعتقد أنه سيرفع معدل الوفيات إلى8,4 مليون في عام 2020 (Joshi et al. 2014)، ويعتمد ذلك على طبيعة المادة المستخدمة وكميتها، ومدة التعرض، وطريقة الاستخدام (Leon Barnes 2003). يحتوي التبغ على 50 عنصراً مسرطناً منها نتروزامينNitrosamine وهيدروكربون أروماتيAromatic Hydrocarbons. كما أنّ التدخين يرفع درجة حرارة الفم مما يساهم في إحداث الأذى (Juliana Hintz Germanos Scheidt 2012)، ويعتبر استخدام التبغ سبباً لـ 90% من الوفيات بين الذكور. يزيد التدخين خطورة الإصابة بالسرطان في مناطق مختلفة من الحفرة الفموية، ويُعتبر قاع الفم المنطقة الأكثر خطورة (Khalili 2008).

1-2-3-2. الكحول:

يحتلّ الكحول المرتبة الثانية من حيث الأهمية وتزداد الخطورة عند تناول ما يزيد عن 30 جراماً يومياً (Khalili 2008). فالكحول (الإيثانول) لا يعتبر بحد ذاته عاملاً مسرطناً وإنما يعزز من آلية التسرطن وذلك من قبل مجموعة متنوعة من الآليات، بما في ذلك نقص التغذية، وآثار الملوثات الموجودة في بعض المشروبات الكحولية، ويرتبط الكحول بفرط تكاثر الخلايا Hyper Proliferation وبالتالي زيادة معدل ذوبان المواد المسرطنة وتعزيز تغلغلها في الأنسجة الفموية والبلعومية،(Galbiatti et al. 2013) (Sridharan 2014) يحدث تأكسد للإيثانول عن طريق أنزيمات كحولية نازعة للهيدروجين(cytochrome p450) ويتحول إلى أسيتالدهيد مما يؤدي إلى إنتاج جذور حرة (Stefano Petti a 2012) (Zygogianni et al. 2011)، كما يؤدي إلى زيادة فعالية الأنزيمات التي تنشط طليعة المسرطن(pro- carcinogens)، والحد من حمض الريتينويك Retinoic Acid، وهناك أيضاً تأثير تأزري بين استهلاك الكحول والتدخين إذ يزيد معدل الخطورة بتكرار استهلاكهما معاً(Maasland et al. 2014) (Hussain Gadelkarim Ahmed et al. 2009) فاستخدام الكحول يعمل على كبت إصلاح الدنا الذي تعرض للتخريب بالنيتروزامين (Leon Barnes 2000; Genden et al. 2010).

1-2-3-3. مضغ التبغ:

ومنه جوزة التنبول (نبات من الفصيلة الفلفلية)، والفوفل، يخلط التنبول مع كربونات الكالسيوم (Little et al. 2014) (Khalili 2008)، والتوابل، والتبغ وبالتالي تنتج مواد قلوية تسمى اريكولين Arecoline مسؤولة عن فرط النشاط Euphria(الشمق)، والتعرقSweating ، والخفقانPalpitation ، كما أنها تعتبر رابع مادة مسببة للإدمان بعد الكحول، والتبغ، والكافيين. تستجيب خلايا الأورمة الليفية والخلايا الكيراتينية keratinocytes, fibroblast لهذه المادة فتعمل على كبح بناء الدنا، وتتوقف دورة الخلية، ويحدث تموت خلوي وزيادة أو نقصان في إنتاج الكولاجين والسيتوكين (Cox et al. 2010). وحسب دراسات الوكالة العالمية لأبحاث السرطان فإن استخدام نبات التنبول أو الفوفل كل على حدة دون استخدام التبغ كافٍ لإحداث سرطان الفم (Chiu et al. 2010).

شكل(1-1) نبات التنبول والفوفل والتبغ والتوابل وكربونات الكالسيوم

1-2-3-4.عوامل أخرى:

ومنها المستوى الاقتصادي والاجتماعي إذ يعاني الفرد ذو الدخل المنخفض من قلة الرعاية الصحية مما يؤدي إلى تراجع الصحة الفموية (Massano et al. 2006)، كما أن لطبيعة وظيفة الفرد تأثيراً مهماً، فمثلاً يعاني الأفراد ذوو النشاط الريفي من تعرض دائم لأشعة الشمس مما يؤدي إلى الإصابة بسرطان الشفاه(Galbiatti et al. 2013) (Khalili 2008). ومن عوامل الخطورة أيضاً استخدام الشّمّة والحشيش، والرض المستمر الناتج عن عدم ثبات البدلة والذي يؤدي إلى تهيج مزمن بالمخاطية (Khalili 2008). وكذلك تتسبب فطور المبيضات البيض بحدوث تكاثر بالظهارة Epithelial Proliferation ينتج عنه عقيدات وبقع بيضاء على المخاطية مما ينتج عنه طلاوة المبيضات البيض والتي قد تترافق بسوء تصنع نسيجي يمكن أن يتحول إلى سرطان بنسبة تقدر ب9-40 % من الحالات (Mehrotra & Yadav 2006) (Meurman 2010).

1-3. الاضطرابات محتملة الخباثة: Potentially Malignant Disorders

يشمل مصطلح قبيل سرطانية الآفات قبيل السرطانية والحالات قبيل السرطانية (J 2012) وتعرف الآفات قبيل السرطانية حسب منظمة الصحة العالمية عام 1978 بأنها تغيرات بالبنى النسيجية Morphologically Altered Tissue وتكون أكثر احتمالاً لحدوث سرطان مقارنة بنظيرتها السليمة من المخاطية (Goyal D 2013). أي إنها آفات قد ينشأ عنها سرطان (S.PORTER 2002) وتشمل هذه الآفات التصبغات البيضاء، والتصبغات الحمراء، وفرط تقران الحنك نتيجة التدخين العكسي Palatal Keratosis Associated With Reverse smoking(Panwar SK1 2013)، أما بالنسبة للحالات قبيل السرطانية فإنها تعرف بحالة طبية عامة ترتبط بزيادة نسبة الخطورة للتحول السرطاني بأي جهة في الفم دون ظهور آفة فموية مسبقة (S.PORTER 2002) وتشمل التهاب الشفة السفعي Actinic Cheilitis (Jerry E. Bouquot & Nadarajah Vigneswaran 2010) (Villa et al. 2011)، وعسر البلع الناجم عن قلة الحديد Sideropenic Dysphagia، والحزاز المنبسط، والتليف تحت المخاطية، والزهري، والذئبة الحمامية القرصية(Napier & Speight 2008)، وجفاف الجلد المصطبغ Xeroderma Pimmentosum، وانحلال البشرة الفقاعي Epidermolysis Bullosa(Panwar SK1 2013). وحديثاً تمّ الاتفاق في مركز التعاون المختص بالسرطان والآفات قبيل السرطانية، وذلك خلال ورشة عمل منسقة عبر منظمة الصحة العالمية في 2005، على تغيير مصطلح قبيل سرطانية إلى الاضطرابات محتملة الخباثة،

ويضم هذا المصطلح الآفات والحالات محتملة الخباثة، هذا وليس بالضرورة أن تكون كل الاعتلالات التي تدرج تحت هذا المصطلح ذات قابلية للتحول السرطاني (Issrani et al. 2013) (Goyal D 2013) (Panwar SK1 2013) (Nair et al. 2012) (Pardeep Goyal & Ashish Aggarwal 2012) .

ستتعرض المراجعة النظرية لهذه الأطروحة لأهم الاعتلالات باختصار:

1-3-1. التصبغات البيضاء Oral Leukoplakia:

تعرف الطلاوة بأنها بقعة أو لويحة بيضاء في المخاطية الفموية لا يمكن إزالتها بالسحج، كما أنه لا يمكن تصنيفها سريرياً أو نسيجياً مثل أي أفة أُخرى (Roshni Roy & Roy 2014) (Sridharan 2014) (Schwarz et al. 2005; George Laskaris 2006)، وتعتبر عرضية مشكوكاً في تحولها إلى الخباثة لأنه لابد من استثناء الأمراض والاعتلالات المعروفة التي لا تحمل أي خطر متزايد للإصابة بسرطان (Liu et al. 2012) ومثال على ذلك داء

المبيضات، وفرط التقران، والوذمة البيضاء، والتهاب الفم النيكوتيني (van der Waal 2009b). تصنف الطلاوة سريريا إلى متجانسة Homogeneous وغير متجانسة Non Homogeneous، تتميز الطلاوة المتجانسة بلويحة رقيقة بيضاء مائلة إلى الرمادي ذات حدود واضحة، أو متداخلة مع الأنسجة المخاطية، وعندما تتقدم الآفة تصبح أكثر قساوة وذات ملمس جلدي Leathery (Puneet Kumar 2012) مع وجود بعض التجعدات Wrinkles (Anand Kumar & Darryl Coombes 2013). أما غير المتجانسة فإما أن تكون طلواناً مبقعاً Speckled (باحة بيضاء وحمراء مع غلبة اللون الأبيض)، أوعقيدات بيضاءNodular صغيرة موجودة على السطح(Parlatescu Ioanina 2013) (Lodi G 2008)، أو أن تكون كتلة خارجية التنبت، وتسمى ثؤلوليةverrucous، ذات سطح مرتفع ومجعد وتبدأ هذه الكتلة بسطح أملس إلى أن تصل إلى المظهر الثؤلولي (WFP van Heerden & Supplement 2011). ومن الطلاوة الثؤلولية نمط آخر ويعرف بالطلاوة البيضاء الثؤلولية التكاثرية Proliferative Verrucous Leukoplakia تتميز بقدرة عالية على التحول السرطاني و تصيب الإناث أكثر من الذكور بنسبة تقدر بـ1:4 وذلك في الستينيات من العمر(Gouvea et al. 2010) ولها أيضاً قابلية عالية للنكس بعد العلاج (Carrard et al. 2013). ومن أسباب ظهور الطلاوة في الدول النامية استهلاك الفوفل، والتبغ، أما في الدول المتطورة فيرتبط ظهورها غالباً بالتدخين وتقدر نسبة الإصابة بها عند المدخنين بسبعة أضعاف ما هي عليه عند غير المدخنين (McCullough et al. 2010). ويعتبر الكحول أيضاً من عوامل الخطورة (D Sujatha 2012).

وتقدر معدلات انتشار الطلاوة عالمياً بـ 0.1-0.5% (Messadi 2013) وقد تصل إلى 3.46% (Lemmer 2012)، كما تقدر نسبة التحول السرطاني فيها بـ 0.13- 6 % (Ramasubramanian et al. 2013)، وترتفع هذه النسبة إلى 31% أو أكثر في حالة وجود سوء التصنع النسيجي (Cervigne et al. 2014). وتبلغ نسبة إصابة المخاطية الشدقية حوالي 25%، ولثة الفك السفلي 20%، واللسان 10% ، وقاع الفم 10%(Lemmer 2012). ويعتمد معدل التحول السرطاني على عدة عوامل منها العمر، والجنس، وموقع الإصابة، وحجم الآفة، واستهلاك التبغ والكحول (Boy 2012). تقدر نسبة سوء التصنع النسيجي في الطلاوة بـ 5-25% وبالتالي تعتبر واصماً لاحتمالية الخباثة ويعتمد ذلك على درجة سوء التصنع النسيجي كما أن سوء التصنع قد يبقى دون تغيير أو يتراجع بينما في بعض حالات الطلاوة دون سوء التصنع النسيجي وقد تتحول إلى سرطان أيضاً(Lemmer 2012) ، (Boy 2012) .

1-3-2. التصبغات الحمراء: Erythroplakia

تعرف الطلاوة الحمراء حسب WHO عام 2005 بأنها آفة في المخاطية الفموية توجد بشكل لويحة حمراء مخمليةvelvety plaque لامعة ولا يمكن وصفها سريرياً أو نسيجياً مثل أية حالة متعارف عليها(Reichart & Philipsen 2005; Villa et al. 2011) (chris de souza 2009)، بعضها يأتي بشكل أملس والبعض ذو سطح منخفض حبيبي(van der Waal 2009b) أو عقيدي قد تحوي بؤراً بيضاء أو صفراء ، تتميز بحواف محددة (Reichart & Philipsen 2005)، ويقدر قطرها بأقل من 1.5سم، وتصيب الأفراد ذوي الأعمار المتوسطة وكبار السن (Panwar SK1 2013)، وعادةً تكون دون أية أعراض ولكن قد يعاني المصاب بإحساس حرقة (Messadi 2013)، ومن أسباب الإصابة بها تعاطي الكحول والتبغ، ونقص فيتامين E،C، والبيتا كاروتين، والتعرض للعوامل المسرطنة، وعدوى فيروسية وعوامل وراثية وجينية(Bianca de Fátima Borim Pulino 2011) وأكثر المناطق عرضة للإصابة بها قاع الفم، جانب اللسان، المثلث خلف الرحوي، الحنك الرخو (Puneet Kumar 2012)، يقدر معدل انتشارها بـ0.02-0.83% (Boy 2012) وقد ترتفع النسبة إلى أن تصل إلى 0.2% (Villa et al. 2011)، كما يقدر معدل التحول السرطاني في بعض الدراسات بـ20-68% (Messadi 2013).

1-3-3. التهاب الشفة السفعي: Actinic Cheilitis

يصيب حافة الشفاه Vermilion Border السفلية وقد يؤثر أيضاً في الشفاه العلوية إذا كانت بارزة نتيجة التعرض المستمر لأشعة الشمس وبالتالي يحدث تغيرات جزيئية وجينية في الخلايا الكيراتينية مما يؤدي إلى نشوء خلايا كيراتينية ورمية، وتكون الشفاه عديمة المرونة، ويلاحظ فيها باحة تقرانية ضامرة، متآكلة، خشنة، متوسفهScaly مع وجود القليل من التجعدات على حافة الشفاه في بعض الأحيان ومع تقدم الوقت قد تتحول إلى سرطان شائك الخلايا (Wood et al. 2011)، ويصيب الذكور ذوي البشرة البيضاء فوق عمر45 عاماً أكثر من الإناث بمعدل1:10. وتقدر نسبة التحول السرطاني فيه ب 6-10% (Bianca de Fátima Borim Pulino & Geraldo Prestes de Camargo Filho 2011).

1-3-4. التليف تحت المخاطي الفموي: Oral Sub Mucous Fibrosis

يرتبط ظهوره باستخدام الفوفل والتنبول (Auluck et al. 2008) والتبغ، وهيدروكسيد الكالسيوم، والاريكولين التي تسبب إطلاق جذور حرة تحفز تكاثر خلايا الأرومة الليفية وزياده إفراز الكولاجين ويظهر في البدء احمرار، وحويصله Vesicle، وتقرح (Farzeen Tanwir

2011)، ويلي ذلك ضمور بالظهارة الفموية مما يؤدي إلى تصلب بالمخاطية الفموية وضزز Trismus وعدم القدرة على الأكل (Vanaja Reddy 2011) (Taneja L 2011) (Saravanan et al. 2013) وتصيب الأعمار بين 20-40 عاماً وتعتبر الإناث أكثر عرضة للإصابة مقارنة مع الذكور بمعدل 1:3 (Dhariwal et al. 2012)، كما يُقدر معدل التحول السرطاني بـ7-13% (Ali et al. 2013).

1-4. تشخيص سرطان الفم والاضطرابات محتملة الخباثة :

عادة يتم الكشف عن سرطان الفم في مراحل متأخرة من المرض وبالتالي تقل احتمالية نجاح المعالجة، ولكن مع التقدم في مجال البحوث تحسنت النتائج السريرية نتيجة لتسهيل الكشف المبكر عن الآفات (Mishra 2012) وبالتالي أنخفض معدل الوفيات، (Scully et al. 2008) وارتفع معدل الحياه، وقل من الإضرار بالصحة وجودة الحياة الناتج عن العمل الجراحي (Majeed Rana & Eckardt 2011) وحديثاً تم تطوير العديد من التقنيات منها مطياف الكتلة، وقد فتح تسلسل الحمض النووي سبلاً جديدةً في تشخيص السرطانات وعلاجاتها . (Pawaiya2 2010)

1-4-1. الفحص العياني التقليدي :

يستخدم أثناء الفحص العياني ضوء الكرسي فقط ويتم من خلاله فحص المخاطية الفموية ويليها الفحص بالجس للآفة المشكوك فيها(Hanken et al. 2013) (Majeed Rana & Eckardt 2011)، يعَتقد البعض أن لها قيمة محدودة في الكشف عن الاعتلالات محتملة الخباثة، وعلى العكس فقد ذكرت دراسات أُخرى بأن لها درجة عالية نسبياً من الحساسية والنوعية والقيمة التنبؤية الإيجابية(Lingen et al. 2008).

1-4-2. الخزعة والتشريح المرضي : Biopsy And Histopathology

تعرف بإزالة نسيج من الكائنات الحية لغرض الفحص المجهري والتشخيص، وتعتبر المعيار الذهبي في التشخيص ويتم أخذ الخزعة من الآفة بعد مرور أكثر من أسبوعين لإزالة العامل المؤثر(Kumaraswamy et al. 2012) ، تعتمد الخزعة الملائمة على عدة عوامل رئيسية منها اختيار موقع الخزعة، ونوع الخزعة، والتخدير الموضعي، و تسليم كمية كافية من العينة إلى المختبر، ووصف سريري دقيق وذو صلة بالأفة مما يساعد أخصائي التشريح المرضي على التشخيص (RM Logan 2010)، فالتدبير السليم لمريض السرطان أو الآفات قبيل سرطانية

يبدأ بالتشخيص الدقيق وأخذ الخزعة بعمق ويقدر عمق الخزعة 4-5 مم بحافة قاطعة مائلة بـ 1.5مم وذلك بسبب ثخانة الظهارة وفرط التقرن بالباحة المصابة (Poh et al. 2008). وقد لوِحظ أن بعض الاعتلالات محتملة الخباثة لا تتغير وقد تتراجع، لهذا تم انتقاد درجة سوء التصنع النسيجي كتشخيص وذلك لخضوعة للمعالجة، وبالتالي سوء استنساخه ويعتبر غير كاف بالإدارة السريرية ولذلك هناك حاجة لعلامات تنبؤيه للتحول السرطاني تفيد في العلاج، إذ لوحظ في الظهارة الفموية ذات الاعتلالات محتملة الخباثة عدم استقرار الكروموسومات واختلال الصيغة الصبغية لهذا اعتبرت مشعراً اساسياً للتحول الخبيث(Sperandio et al. 2013).

1-4-3. الخزعة بالفرشاة :OralCDx_ Brush Biopsy

تستخدم فرشاة مخصصة لجمع الخلايا من طبقات الظهارة الثلاث(Seijas-Naya et al. 2012)،(Mehrotra & Gupta 2011) ، (Reddy et al. 2012) وتثبت في شريحة زجاجية وترسل إلى المخبر لعمل لطاخة بابا نيكولا ثُمَ تُمسح وتحلل مجهرياً عن طريق نظام التصوير المحوسب(Messadi 2013)، ويمكن أن تصنف الخلايا على أساس درجة التشكل غير الطبيعية ويتم تفسير النتائج عن طريق أخصائي التشريح المرضي فتبين النتيجة السلبية بأنه حميد بينما تفسر الإيجابية بوجود خلايا غير طبيعية (Patton et al. 2008، Mehrotra et al. 2011) تعتبر غير باضعة، ورخيصة نسبياً، وغير مؤلمة ومقبولة عند المريض(Seijas-Naya et al. 2012)، وتقدر حساسية الجهاز بـ52-100%، وخصوصيته بـ29-100% إذ يعطي نسبة كبيرة من النتائج الكاذبة(Seoane Leston & Diz Dios 2010).

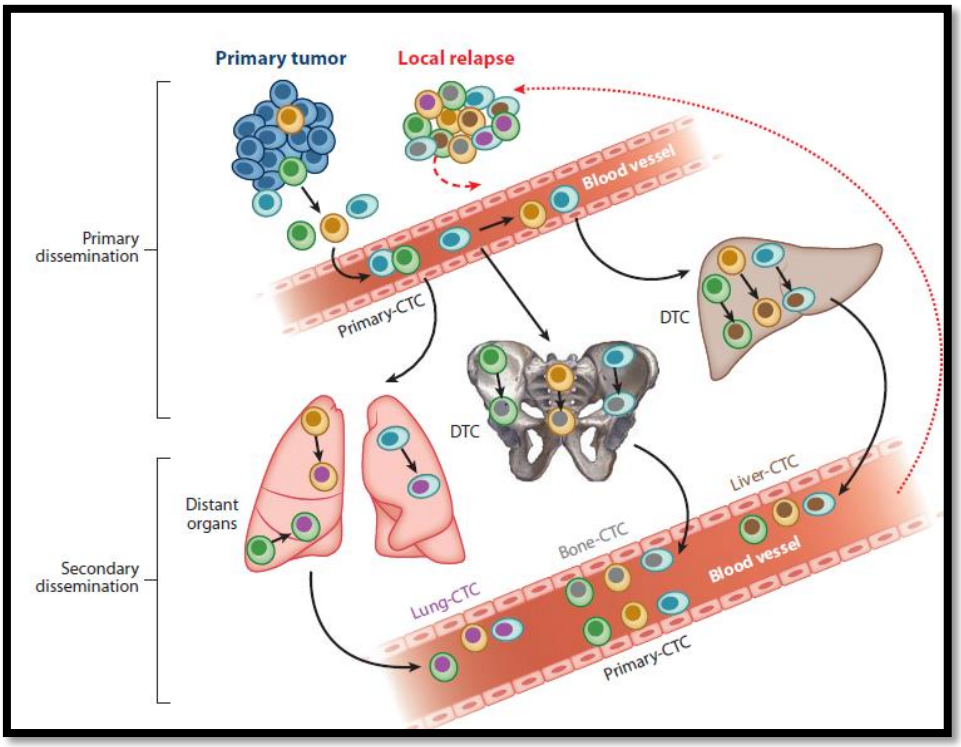
1-4-4. تصوير التألق او الومضان النسيجي VELSCOPE :

وتستند هذه التقنية على فرضية ان الخلايا الطبيعية تتوهج عند تعرضها للتألق الضوئي بينما الخلايا غير الطبيعية تظهر بلون اسود(Ben Balevi 2007)، يتأثر التألق النسيجي في الحفرة الفموية بعدة عوامل منها التغيرات الهيكلية، النشاط الايضي، وجود الهيموجلوبين بالأنسجة، توسع الاوعية الدموية، وقد لوحظ بان التعرض لأطياف الضوء الازرق (400-460 نانو متر) تعطي تمييز واضح للباحة التي تمر بمراحل تغير ورمي حيث يتظاهر لنا فقدان التألق النسيجي (Patton, Epstein et al. 2008)، تعتبر تقنية سهلة، امنة وينتهي الفحص بشكل كامل بدقيقتين(Masthan, Babu et al. 2012).

1-4-4. طرق التشخيص الحديثة New diagnostic approaches :

نتيجة لما تم ذكره آنفاً عن السلبيات الكامنة وراء الطرق التقليدية المتبعة لتشخيص سرطان الفم، يتم التوجه حالياً لاستخدام طرق حديثة بديلة للطرق السابقة. إن التبدلات الجينية في الخلايا السرطانية تؤدي إلى تغيير في نمط التعبير الجيني مما يؤدي إلى حدوث اختلافات جوهرية في هذه الخلايا وتحولها من خلايا طبيعية إلى خلايا سرطانية، يُمكن استخدام هذه التبدلات كواسمات حيوية جزيئية في تشخيص الحالات السرطانية كما يتم التوجه حالياً للاستغناء عن الخزعات باعتبارها من الاختبارات الباضعة واستخدام العينات الدموية أو سوائل الجسم (الدم والمصل واللعاب والنطاف) كأوساط للكشف عن هذه التبدلات مما يُمكن الباحثين من الكشف المبكر عن الآفات السرطانية أو ما قبل السرطانية(Li et al. 2004) (Afshan N. Malik 2011).

رغم التطور الحاصل في تشخيص سرطان الفم ولكن يبقى معدل الوفيات كبيراً جداً يعزى ذلك إلى وجود النقائل المجهرية micro metastasis التي كانت تعرف سابقاً بأنها نقائل ذات قطر اقل من 0.2 سم اما حالياً فقد شمل التعريف الخلايا الورمية الجائلة circulating tumor cell التي تتواجد في الدم المحيطي، نقي العظام، العقد اللمفاوية، وسوائل الجسم، يمكن لهذة الخلايا أن يتم اطراحها بعد انفصالها من الورم الرئيسي إلى المجرى الدموي وبالتالي يمكن أن ترتشح إلى الاعضاء بعيدة عن الفم اذ يمكن أن تبقى بهذة الاعضاء بشكل هاجع عدة سنوات قبل أن تعاود نشاطها كذلك ممكن أن تنفصل من الأعضاء الثانوية وتنتقل مرة إلى أعضاءآخرى أو تعود إلى مكان الآصابة البدئي(Weigelt et al. 2005، Alix-Panabieres et al. 2012،2007 Gormally et al.) ولهذا تعتبر واصمات جزيئية للتشخيص المبكر للمرض، ومؤشراً على الانتقال الورمي، وتستخدم لتحديد طرق العلاج(Markopoulos et al. 2010) شكل(1-2)، ويعرف الواصم الحيوي بجزيء حيوي أو هرموني قابل للقياس متواجد في الأنسجة والدم وسوائل الجسم قادر على كشف الإضطرابات الخبيثة أو محتملة الخباثة، قادر على التنبؤ بالإنذار والتكهن بإستجابة للعلاج يمكن أن يكون بروتينات(أنزيمات، أو مستقبلات) أو أحماض نووية وأضاد(Hinestrosa et al. 2007; Henry & Hayes 2012).



شكل((1-2) الخلايا السرطانية تترك الورم الرئيسي وتنتشر من خلال مجرى الدم. في كل مرة تجول الخلايا الورمية circulating tumor cell CTCs) تصل إلى اعضاء بعيدة، على سبيل المثال، العظام، الكبد، أو الرئة في سرطان الثدي، كما انها تغادر الاعضاء لتنتشر مرة آخرى إلى مجرى الدم.(Alix-Panabieres et al. 2012)

1-4-4-1. تشخيص سرطان الفم عن طريق اللعاب Saliva –Based Oral Cancer Diagnostics :

يعرف اللعاب بسائل مائي موجود في الحفرة الفموية، ويتألف من خليط معقد من المنتجات المُفرزة (العضوية وغير العضوية) من الغدد اللعابية وغيرها من المواد القادمة من البلعوم الفموي Oropharynx، المسلك الهواء العلوي Upper Airway ، ارتجاع مَعِدِيّ مِعَوِيّ Gastrointestinal Reflux، سائل النَّلَم اللّثَوِيّ Gingival Sulcus Fluid، ورواسب الغذاء Food Deposits، والمركبات المشتقة من الدم Blood-Derived Compounds(Lima et al. 2010) (Pfaffe et al. 2011)، والإفراز المخاطي للتجويف الأنفي Nasal Secretion ، وخلايا ظهارية متوسفة Desquamated Epithelial Cell ، وآثار الأدوية والمواد الكيميائية المستخدمة، البكتيريا ومنتجاتها، والفيروسات (Malathi et al. 2014) (Castagnola et al. 2011)، لذا يعتبر اللعاب واسماً للأمراض الجهازية والفموية(Sandra K. Al-Tarawneh 2011)، ويقدر PH اللعاب بـ6.0-7.0 وتنتج الغدد اللعابية حوالي 1-1.5 لتر يومياً(Lee & Wong 2009)، ويشكل الماء 99% من مكونات

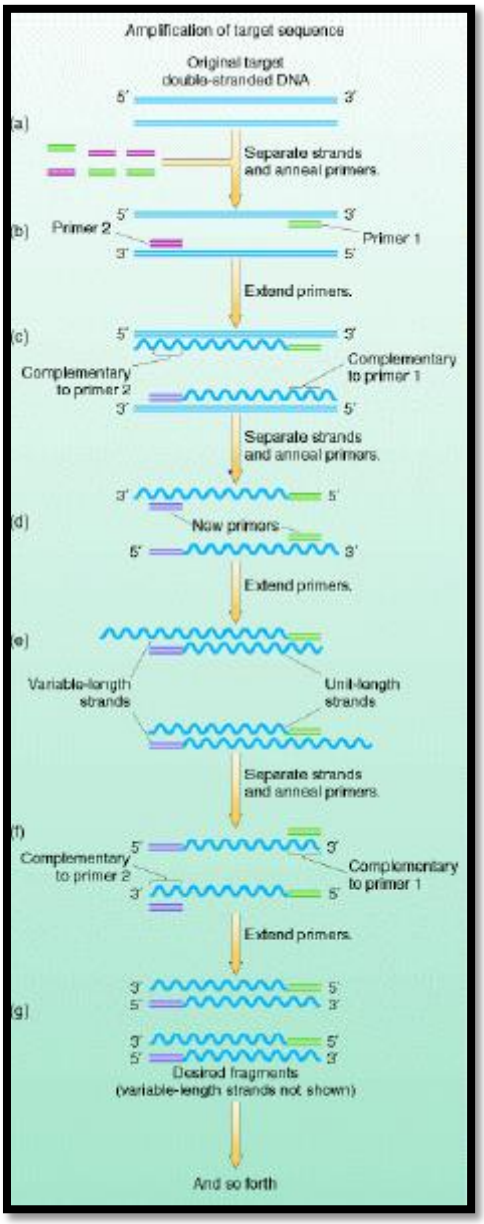
اللعاب، ويتألف الجزء غير العضوي من أيونات ضعيفة وقوية منها الصوديوم، والبوتاسيوم، والكلور، والمغنسيوم، أما الجزء العضوي فيحتوي إفرازات من الجسم منها (اليوريا وحمض اليوريك والكرياتنيين)، ومنتجات تَفَسَّخ منها(بوتريسينPutrescine ، كادافيرينCadaverine ، ودهوناً منها (الأحماض الامينية، الكوليسترول)، وأكثر من 400 نوع من البروتينات إما أن تكون ذات مصدر غدي Glandular Origin (ألفا- آميلاز، لاكتوفيرين، هيستاتين، الليزوزوم، البرولين الغني بالبروتين) أو مستمدة من البلازما مثل الألبومين، والمفرزات المناعية، ترانسفيرين(Lima et al. 2010).

يعد اللعاب من أحدث الوسائل التشخيصية لسرطان الفم يتمتع بالعديد من المميزات ويعتبر وسيلة تشخيصية غير باضعة (Cheng et al. 2014) وبالتالي يحد بشكل كبير من القلق، والانزعاج والألم من قبل المرضى لذلك يستخدم لكبار السن والأطفال أيضاً، وهو يتميز بالإضافة إلى كفاءته العالية بسهولة الحصول عليه، وسهولة جمع العينات وتخزينها وشحنها، وسهولة الحصول على حجم عينة كبير للتحليل، كما أنه لا يحتاج إلى أية معدات خاصة لجمع العينة، ولا يتجلط لهذا لا يحتاج إلى اية معالجة قبل التحليل، ويمكن أخذ عينات متكررة للمراقبة، ويسمح بتخزين العينات لفترة طويلة نسبياً بدرجة حرارة الغرفة قبل استخلاص الدنا مع فقدان حد أدنى منه(Dominique Quinque 2006) (Shah et al. 2011) (Ahmadi Motamayel 2010) (Wu et al. 2010)، كما أنه يعتبر الأقرب لسرطان الفم وذلك للالتصاق الدائم بين اللعاب والغشاء المخاطي حيث يتطور السرطان(Farnaud et al. 2010)، فالعلاقة بين مستويات الدم والسائل الفموي يجعل اللعاب واسماً حيوياً للكشف عن سرطان الخلايا الحرشفية، ففي الوقت الحاضر يستخدم اللعاب في الكشف عن العديد من الأنماط المورثية المرتبط حدوثها بسرطان الفم(Punyani & Sathawane 2013)، ويعبر عن الواصمات الجزيئية بثلاثة مستويات وهي تغيرات في الدنا مما ينتج عنها تغيرات في استنساخ الرنا المرسال وبالتالي تغيرات في مستويات البروتين داخل الخلية وخارجها فتظهر العديد من التغيرات عند المريض منها سوء التصنع النسيجي، والطفرات، والخبن(الحذف)، والأزفاءTranslocation ، والمثيلة، ووجود فيروس الورم الحليمي البشري، وطفرات بالدنا المتقدري وغيرها(Ramnarayan Belur Krishna Prasad 2013).

1-4-4-2. سلسلة تفاعل البلمرة PCR :

عبارة عن تقنية علمية في البيولوجيا الجزيئية، نشأت عام1984 من قبل العالم Kary Mullis (Dr.Mohini Joshi 2010)، ويشمل هذا التفاعل خليطاً من الدنا المستهدف،البادئات، النوكليوتيدات الحرة (ديوكسي ريبونوكيلوتيد ثلاثي الفوسفات(dNTPs) ، وشاردة المغنسيوم Mg، مكونات دارئة(Buffer)، أنزيم الدنا بوليمراز وماء(Elizabeth van Pelt-Verkuil 2007c; Okafor 2007)، إذ تسمح بتخليق أسي خاص لمنطقة في الحمض النووي محددة سلفاً إذ يتم تهجين hybridization زوج من عديد النوكليوتيد الصنعية synthetic oligonucleotides تدعى البدئات primers كلّ إلى طاق مفرد single strand من التسلسل الهدف وفق الاتجاه `5إلى`3، أي انه صممت خصيصاً لتشكل نهايتين في جزئ الحمض النووي ليتم تضخيمها، لهذا يعتبر التضخيم عن طريق سلسلة تفاعل البلمرة نوعياً ومحدداً وتحدد هذه الخواص عن طريق تصميم البادئات ذات سلسلة نوعية وخاصة لتكملة السلسلة الموجودة في جزيء الدنا المراد تضخيمه، وتتكون هذه البادئات من سلسلة نوكليوتيدات محددة للتهجين إما بشكل عكسي الاتجاه أو بنفس الاتجاه لذراع جزيء الدنا المستهدف ولابد من أن تكون هذه السلسلة مكملة بشكل دقيق للسلسلة المستهدفة، ولذلك عند ارتباط المبدء بالدنا المستهدف يعطي لنا نهاية هيدروكسيل في `3 (منطقة الارتباط) بينما نهاية `5 تعتبر ناحية محفزة وتحوي أنزيمات الاقتطاع وبواسطة أنزيم الدنا بوليمراز يصنع الدنا (Elizabeth van Pelt-Verkuil 2007a)، (Birch 2002) وبما أن سلسلة تفاعل البلمرة تستخدم اثنين من المبدئات (يصمم كل مبدء لطاق واحد من جزيء الدنا المراد تضخيمه)، أثناء تكرار الدورات لتهجين المبدئات Annealing والتفارق Disassociation ينتج لدينا سلسلة دنا مضخمة في اتجاه `5 إلى `3 في كلا ذراع سلسلة الدنا إذ تعمل البادئه كشظايا أوكازاكي بشكل فعال، تعتبر عملية التضخيم عملية دورية، إذ تمسخ(Denaturation) عينة الدنا ويتم فيها حل طاقي الحمض النووي الحلزوني وفصلهما كل طاق على حدة(Elizabeth van Pelt-Verkuil 2007b) ويتم ذلك بتسخين عينة الدنا إلى درجة حرارة 94 درجة مئوية(تمسخ Denaturation)(cornel mulhardt 2007) خلال 20 ثانية – 5 دقائق تحت ظروف بيئية مائية، تليها مرحلة تهجين أو ارتباط للمشرعات (الارتباط Annealing) في طاق الدنا الخاص به إذ تخفض درجة الحرارة في هذه المرحلة مابين 65 إلى 40 درجة مئوية (ويعتمد ذلك على تصميم البادئة المستخدمة وغناها ومحتواها من CG)، بعد هذه العملية يتم رفع درجة الحرارة إلى ما يقارب 72 درجة مئوية(الاستطالة Elongation Replication) (Elizabeth van Pelt-Verkuil 2007b) تحتاج هذه التقنية إلى وجود أنزيم تم استخلاصه من جرثوم متحمل للحرارة Thermophilic Bacterium، Thremus

Aquaticus (Taq) يعتبر مستقراً بدرجات الحرارة العالية ولا يحدث له تمسخ من قبل المعالجة الحرارية المتكررة (BruceA Iberts 2008a)(AYGAN 2006) ، وتعاد هذه الدورات تكراراً وبالتالي ينتج بعد كل دورة تضاعف جزيء دنا مضاعف السلسلة(Tavares RG 2011) يحوي نهاية السلسلة والذي تستكمل بسلسلة البادئة المستخدمة وتسمح هذه العملية لهذا الجزء المضخم باستخدامه كمرصاف (Template) للتضاعف في الدورات التالية لسلسلة تفاعل البلمرة مما ينتج عنه في النهاية تضاعف للجزيء المستهدف خلال كل دورة (التضخيم الاسي)(Elizabeth van Pelt-Verkuil 2007b; Walsh 2007; Dr.Mohini Joshi 2010)، شكل (1-3) ومن مزايا هذه التقنية النوعية أنه يمكن تحديد الطفرة وبدقة عالية في شريط مزدوج من النوكليوتيدات في سلسلة الدنا التي تحوي الآلاف من الأزواج الأساسية، كما تتميز بالسرعة، وسهولة الاستخدام، والكمية فيمكن تحليل العديد من العينات في الوقت نفسه .(Brooks 1998)



شكل (1-3) مبداء التفاعل التسلسلي للبوليميراز pcr (Habbal 2006)

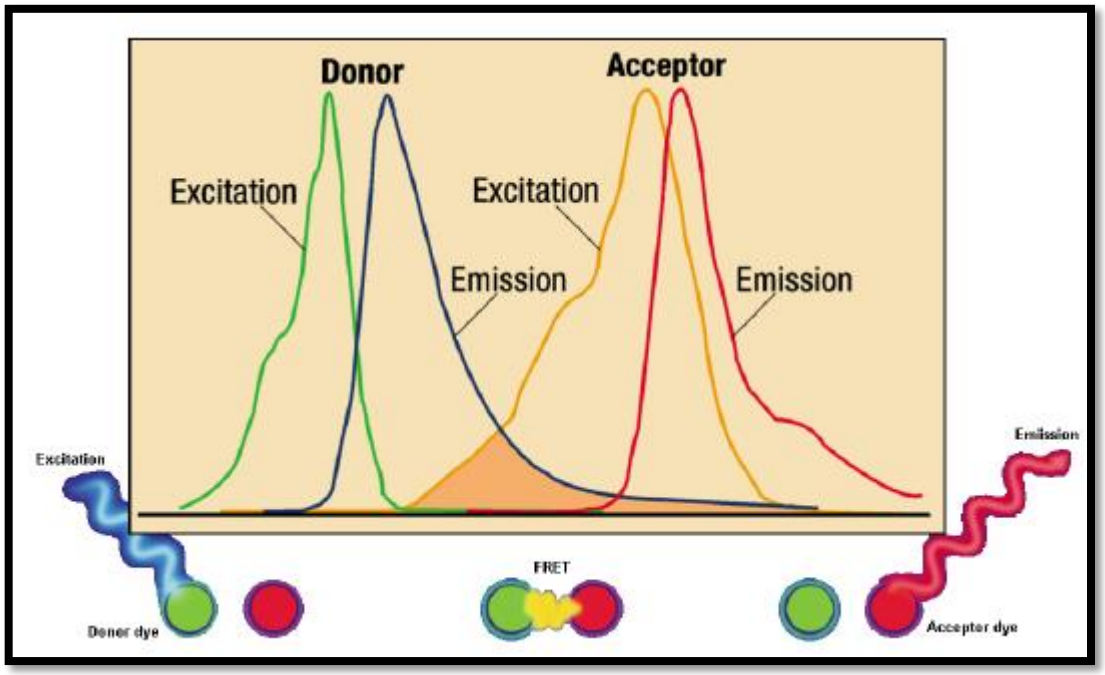
1-4-4-3. المتابعة اللحظية لتفاعل البوليميراز التسلسلي Real Time PCR :

أدخلت هذه التقنية عام 1992 من قبل العالمHiguchi وزملائه وتعتبر تعديلاً لسلسلة تفاعل البلمرة التقليدي(Dean Fraga 2008) وتتميز بحساسية ودقة عالية في كشف كمية ضئيلة من سلسلة الدنا المستهدف (Bar et al. 2012)، وذلك للحساب الكمي في مرحلة التضخيم الأسي حيث تكون كفاءة التضخيم في حدها الأقصى وبالتالي تجنب المشاكل النتي تنجم عن تحليل(Analysis) الدنا في نهاية التفاعل أي إنه يمكن حساب الكمية المضخمة بعد كل دورة تفاعل وذلك بقياس إشارة التألق fluorescence (Guarnaccia et al. 2014) والذي بدوره

ينتج بإدخال مواد مفلورة إضافية (SYBR Green, EVA Green) أوعن طريق الكشف النوعي لتألق المسبار Probe (مسابير التهجين Hybridization Probes ، مسابير الحلمهة Hydrolysis probes، ومسابير Molecular Beacon، ومسابير Scorpions وغيرها) فزيادة التألق يتناسب مع الكمية البدئية للجزيء المستهدف، ويتم القياس باستخدام منحنى معياري مرجعي (Standard Reference Curve) مصنع من توالٍ جينيٍّ مستنسخ لمنطقة مستهدفة أو باستخدام دنا لمنطقة مستهدفة مستخرج من كمية معروفة من الخلايا(Penna & Galluzzi 2013)، كما تتميز هذه التقنية بالحد الأدنى من خطر التلوث وذلك لغياب المعالجة بعد انتهاء التفاعل وإجراء التفاعل بجهاز مغلق بشكل أوتوماتيكي(Shokoples et al. 2009) (Ma et al. 2008)، وتتميز أيضا بنطاق ديناميكي واسع للكشف عن الجزيئات المستهدفة مما يزيد عن 8 أوامر مقارنة بالـ PCR التقليدية(Guarnaccia et al. 2014).

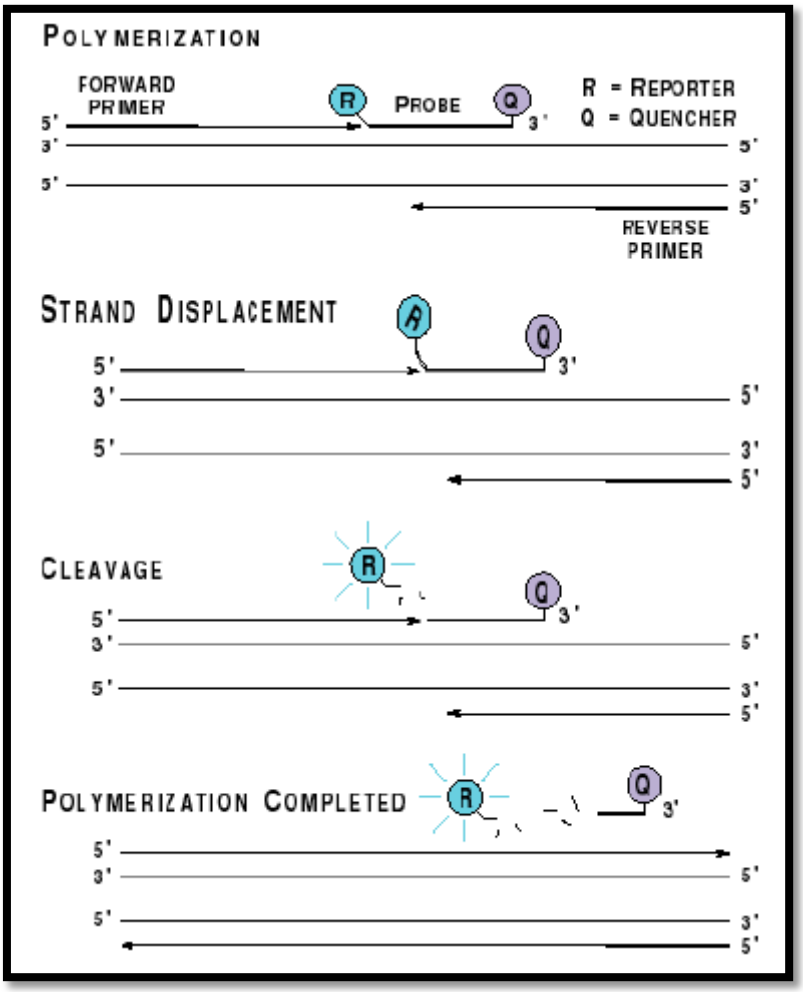
مبدأ الكشف النوعي Specific Detection :

تتحقق نوعية الكشف باستخدام المسابير(Prope) الموسومة النوعية للتسلسل الهدف، وتعتمد غالباً على قياس طيفي spectroscopic process تدعى fluorescence resonance energy transfer(FRET) مابين جزيئين تمتلكان طيفي إصدار Emission وإثارة Excitation متداخلين شكل(1-4)، وتبعدان عن بعضهما مسافة انغستروم A° 10-100، ويكون لكلاهما صباغي تألق fluorogenic labels أحدهما معطٍ doner والآخر متلقٍّ acceptor، أو يكون أحدهما صباغاً متألقاً fluorophore والآخر مخمداً dark non-fluorescent quencher يبعثر الطاقة بشكلٍ حراري بدل التألق، كما ينبغي أن يحقق الصباغ المختار سهولة الربط بجزيئة الدنا وتعديل الإشارة حالما يتمَّ التهجين النوعي وإمكانية الكشف عند تراكيز منخفضة وعدم التداخل مع فعالية أنزيم الدنا بوليميراز والثبات بدرجة حرارة مرتفعة(Mackay et al. 2002).



الشكل (1-4) تداخل طيف إصدار emission الصباغ المعطي doner مع طيف إثارة excitation الصباغ المتلقّي acceptor شرط لتمام عملية نقل الطاقة بينهما Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET) (Habbal 2006)

مسابير الحلمهة Hydrolysis Probes : تعتمد على استخدام عديد نوكليوتيد Oligonucleotide واحد موسوم بصباغٍ متألّقٍ Reporter في نهايته `5، وبآخر مخمّدٍ Quencher في نهايته`3، يتم نقل الطاقة فيما بينهما بعملية Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET) وتخميد إشارة التألق طالما بقي المسبار سليماً، إلى أن يتمّ تهجينHybridization المسبار إلى التسلسل الهدف في مرحلة التلدين Annealing، ثمّ شطر Cleavage الصباغ المتألّق Reporter وتحريره أثناء مرحلة الإطالة Extension بتأثير فعالية 5`Nuclease التي يتمتّع بها أنزيم Taq Polymerase، عندها تزداد شدة التألّق مشيرةً إلى إتمام تفاعل البلمرة Polymerization وتضخيم التسلسل الهدف، دعيت هذه المسابير TaqMan Probes (Penna & Galluzzi 2013) شكل(1-5).



الشكل(1-5) مبدأ كشف ناتج التفاعل PCR بمسابير الحلمهة TaqMan probes في نهاية مرحلة الإطالة extension حيث يشطر أنزيم nuclease الصباغ المتألّق R لتصدُر عنه إشارة التألق بعد امتناع نقل الطاقة بين الصباغين Q وR (Habbal 2006) حيث يمر التفاعل بثلاث خطوات الأولى هي مرحلة التهجين حيت ترتبط المبدئة والمسابر، المرحلة الثانية البناء او التطويل والمرحلة الثالثة وهي مرحلة الانتهاء.

1-5. الخلية:

1-5-1. لمحة تشريحية:

تعتبر الخلية البنية الأساسية للكائن، وتصنف خلية بدائية النواة وذلك لعدم احتوائها على غشاء نووي يحيط بالنواة وخلية حقيقية النواة تحوي نواة محاطة بغشاء وتعتبر مركزاً للدنا النووي إذ يتخذ موقعه على العديد من الصبغيات، وتشمل الخلية العديد من العضيات منها النواة، والريبوزوم اللذان يرتبطان مع بعضهما البعض في الهيولى، وعضيات جهاز الغشاء الداخلي، وجسيمات تأكسدية(بيروكسدية)، وفجوات، وعضيات ذات علاقة بإنتاج الطاقة وهي البلاستيدات الخضراء في الخلية النباتية والمتقدرات في الخلية النباتية والحيوانية وأخيراً هيكل الخلية ويشكل

شبكة من خيوط البروتين ونبيبات وبالتالي يحافظ على شكل الخلية كما يسمح بحركة العضيات (Eberhard Passarge 2007) (s.mader 2007) (mader 2007).

1-5-2. النواة :Nucleus

تعتبر أكثر العضيات أهمية في الخلايا الحقيقية وتحاط بغشاءين بشكل مضاعف يشكلان غلاف النواة (Walter 2009) وتحتوي على الكروماتين (الصبغيات) اما حقيقي كثيف او متغاير وبروتينات (الهستونات) ورنا رسول بدئي. تتوضع المؤرثات على الدناي المضاعف وتكون الوحدة الوراثية وتكون محموله على الصبغيات . (s.mader 2007) (mader 2007) .

1-5-2-1. تركيب الدنا: The Structure Of DNA

يتكون الدنا من شريط حلزوني مضاعف ويتشكل كل من السكر والفوسفات البنية الخارجية للدنا بينما يشكل زوج من القواعد البنية الداخلية، ويشمل الدنا أربعة أنواع من النوكليوتيدات اثنين منها تحوي اسس بورينية(أدينين، غوانين) ويشكلا حلقة مضاعفة اما النوكوليووتيدات الاخرى ذلت اسسا بيريميدينية (ثيمين، سيتوزين) ويرتبطان بوساطة روابط هيدروجينية(mader 2007)، ويكون الذراع الاول متمم للذراع الثاني بحيث يرتبط الأدنين ب للثيامين والجوانين متمماً للسيتوزين(Jan Koolman 2005) .

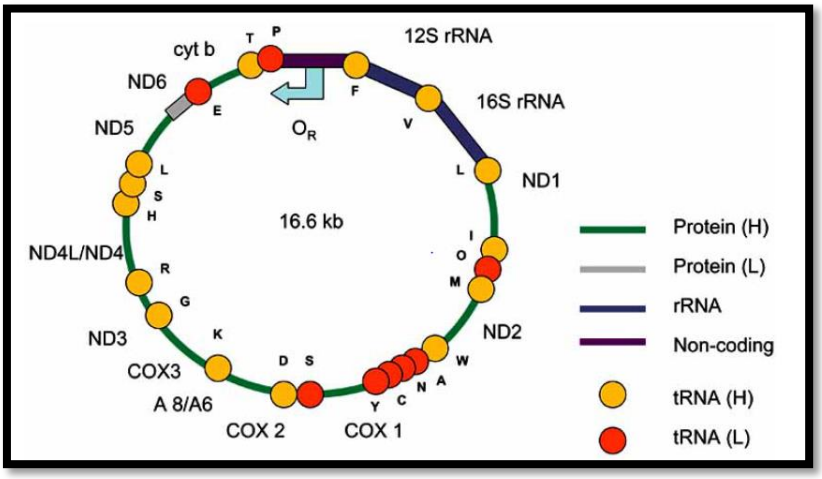
1-5-2-2. آلية تضاعف الدنا : Replication Of DNA

ويشير هذا المصطلح إلى عملية مضاعفة لجزيئات الدنا تستخدم خلال هذه العملية جزيئات الدنا شريط الدنا الام الأصلية(Original) كمرصاف(Template) وتسمى هذه الآلية بتضاعف نصف محافظ (Semiconservative Replication) وذلك لان يستم الاحتفاظ بذراع قديم مع ذراع جديد في الدنا الجديد. وتبدأ عملية التضاعف بإزالة الالتفاف في ذراع الدنا المرصاف وذلك بكسر روابط الهيدروجين بين أزواج الاسس الآزوتية بواساطة أنزيم الهليكاس(Helicase) يتم حمل النوكليوتيدات بواسطة الدنا بوليمراز ويصفهم بالمنطقة المتممة حيى ينتهي تشكل الذراع الجديد .(s.mader 2007) (mader 2007).

1-5-3. المتقدرات :Mitochondria

1-5-3-1. البنية والمحتوى الجيني للمتقدرات Mitochondrial Structure And Genome

تعتبر المتقدرات من العضيات شبة المستقلة في الخلية ويتراوح قطرها بين 1-2 Mm وتحتوي على العديد من نسخ الدنا المتقدري تتراوح من 10 نسخ في كل خلية وعدد المتقدرات في الخلية تختلف حسب نشاطها فهي تتراوح بين 100-40 ° متقدرة، وهو ذو ذراع مزدوج حلقي الشكل وبالتالي أكثر مقاومة للتحطم بواسطة الانزيمات النوكلياز الخارجيه (Kavlick et al. 2011)، يبلغ طوله 16569 شفع اساس من النوكليوتيدات، يختلف عدد المتقدرات وشكلها باختلاف نوع الخلية (Eberhard Passarge 2007)، وتُشكل من 0.5-1% من الحجم الكلي للدنا في الخلية، وتحوي ذراعاً ثقيلاً H-Strand وذراعاً خفيفاً L-Strand(Fernandez-Silva et al. 2003) تحاط المتقدرة بغشاءين غشاء خارجي وغشاء داخلي يحوي العديد من الأعراف البارزة لذاخل المطرق. يحتوي المطرق(Matrix)على الرنا بأنواعة والدنا المتقدري. وتشكل المتقدرات المصدر الأساسي لإنتاج الطاقة من خلال التنفس الخلوي (mader 2007)، تحوي37 مورثة ترمز 13 لجين السلسلة التنفسية، و2 لرنا ريباسي (S12,S16)، و22 لحمض ريبي نووي نقال (Chatre & Ricchetti 2013) (Higuchi 2012a) (SHI FENG 2011)، (Dasgupta et al. 2012)، كما أنها تحتوي على قطعة غير مرمزة (Non Coding)، ذات طول 1 كيلوبايت، مضاعف الطاق هي ثلاثية الطاق تسمى D-LOOP( ) Displacement loop وذلك لأنه بعد عملية التضاعف تنتج سلسلة جديدة تتكون من 500-700 نوكليوتيد وتبقى مرتبطة مع L-Strand (Fernandez-Silva et al. 2003) تعتبر D-Loop منطقة في الدنا المتقدري تنظم عملية نسخة والتضاعف ولهذا لا تترافق عملية النسخ في المتقدرات مع النسخ في النواة مما ينتج عنه نسخ مستقل للدنا في المتقدرات أكثر من مرة واحدة في كل دورة للخلية حتى إذا لم يتم فيها انقسام خلوي (Yu 2011) .



شكل(1-6) تركيب المجين المتقدري(josephine S . Modica-Napolitano 2007)

1-5-3-2. خصائص الميتوكندريا: Peculiarities Of Mitochondria

- تحتوي كل خليه على 100 – 400 من المتقدرات(Lee & Wei 2009) (Kujoth et al. 2007) وتحوي كل متقدرة 10 نسخ من الدنا المتقدري . (Radpour et al. 2009) وتصنف إلى نسخ متطابقة تحوي نفس المورثة Homoplasmic (تحوي إما مورثة طبيعة كاملةً أو مورثة بطفرات) بينما Heteroplasmic عبارة عن احتواء المتقدرات على مورثه طبيعة وآخرى بطفرات (Chatterjee et al. 2011) (Dasgupta et al. 2010)

- تورث جينات المتقدرات عن طريق الأم(Chatterjee et al. 2011) (Debray et al. 2008).

- عال الطفور أي أنه معدل حدوث التغيير في الدنا المتقدري اسرع منه في الدنا النووي، وذلك لعدم احتواء الدنا المتقدري على الانترون والهيستونات، وكذلك لمحدودية طرق الإصلاح عند تضاعف الدنا المتقدري وانتساخه، كما تقوم المتقدرات بإنتاج كميات كبيرة من الجذور الحرة على مقربة من الدنا المتقدري مما يجعله

عرضة للطفرات، (Kassem et al. 2011) (Dasgupta et al. 2010) (Radpour et al. 2009)،(Kulawiec et al. 2009).

- تترجم جينات المتقدرات باستخدام شفرات مورثة على نحو مغاير عن ترجمتها في النواة مثال على ذلك UGA يعتبر شفرة انتهاء في النواة ولكنه في المتقدرات يرمز للتربتوفان، و AGA,AGG تعتبر شفرة انتهاء في المتقدرات ولكنها في النواة ترمز للحمض الأميني أرجنيين(Fernandez-Silva et al. 2003)

1-5-3-3. آلية تضاعف الدنا المتقدري: MtDNA Replication

تكون عملية التضاعف بمنطقتين غير مرتبطتين مع بعضهما البعض فهي تبدأ في H^0 وهي منطقة تضاعف للسلسة الثقيلة وتقع إلى أسفل من LSP (L- strand promoter) في D-LOOP حيث يبدأ الدنا بوليمراز بتصنيع السلسلة الثقيلة وذلك من خلال قراءة السلسلة الخفيفة ويستمر التضاعف باتجاه عقارب الساعة إلى أن تنتج السلسلة الثقيلة الوليدة فعندما تصل السلسلة الثقيلة بتضاعفها إلى منطقة O_L تنزاح ويبدأ هنا تضاعف السلسلة الخفيفة في الاتجاه المعاكس (Fernandez-Silva et al. 2003)، يسمح هذا التضاعف غير المتناظر لكلا السلسلتين بالاستمرار وتأخذ هذه العملية ساعة كاملة بمعدل تصنيع 270 نوكليوتيد بالدقيقة، بعد انتهاء العملية تنفصل السلسلة الناتجة ويتشكل دنا متقدري ذو سلسلة دائرية مغلقة (Fernandez-Silva et al. 2003) (Smits et al. 2010).

1-5-3-4. وظيفة المتقدرات Mitochondrial Function

تلعب المتقدرات مجموعة من الأدوار الهامة منها إنتاج الطاقةATP من خلال التنفس الخلوي والفسفرة التأكسدية وإنتاج المواد المتفاعلة الأكسجينية إضافة إلى دورها في الموت الخلوي المبرمج (Gaude & Frezza 2014) (Kulawiec et al. 2009) (Lan et al. 2008).

1-5-3-4.اولاً. إنتاج الطاقة:

التنفس الخلوي: Cellular Respiration

خطوات تحطيم السكر بشكل متكامل:

خارج المتقدرات : Outside The Mitochondria

تعتبر أكسدة الركيزة (Substrate) الجزء الجوهري في عملية التنفس الخلوي وتحتاج عملية الأكسدة خلال التنفس الخلوي إلى أنزيمات ويتم ذلك عن طريق مساعد غير بروتيني يسمى تميم

الانزيم (coenzymes) فعند أكسدة الجلوكوز يستخدم NAD و FAD فيستقبلان ذرة الهيدروجين والإلكتروناً ويصبحان NADH، FADH2 وينتج عن هذه العملية ثاني أوكسيد الكربون والماء(s.mader 2007).

تحلل السكر :Glycolysis

تحدث هذه العملية في الهيولى خارج المتقدرات ويتم فيها تحطيم الجلوكوز(6 carbon atom) إلى جزئيين من البيروفات (pyruvate 3 carbon atom) (Walter 2009)

ففي حالة وجود الأوكسجين تدخل البيروفات المنتجة من عملية تحلل السكر المتقدرات وتخضع لعملية تحطيم إضافية أما في حالة عدم وجود الأوكسجين فتختزل البيروفات إلى لاكتات (s.mader 2007).

داخل المتقدرات: Inside The Mitochondria

تمر عملية التنفس الخلوي بثلاث مراحل داخل المتقدرات وهي :

تحضير التفاعل: Preparation Reaction

ويحدث مرتين لكل جزيء جلوكوز وذلك لأن عملية تحلل السكر ينتج عنها جزيئان من البيروفات أذ تتم أكسدة جزيء البيروفات ويتحول إلى 2-Carbon مجموعة الأستيل(AC2) والتي بدورها ترتبط مع متمم الأنزيم (CoA) ويتشكل Acetyl-CoA وينتج ثاني أوكسيد الكربون كما تنقل الإلكترونات من البيروفات بواسطة NAD ليتشكل NADH+H (Jeremy mader 2007) (M.BERG 2002)

دورة حمض الستريك : The Citric Acid Cycle

تتم عملية أكسدة ونزع الكربوكسيل للـ Acetyl-CoA بواسطة عدة أنزيمات قابلة للذوبان من معقد بيروفات ديهيدروجيناز (Pyruvate Dehdrogenase Complex) والتي تقع في مطرق المتقدرات باستثناء أنزيم سكسينات دهيدروجيناز(Succinate Dehydrogenase) فهو غير قابل للذوبان ويتخذ موقعه في الغشاء الداخلي للمتقدرات وتمر هذه العملية بثماني خطوات تحفيزية يطلق عليها دورة حمض الستريك (Modica-Napolitano et al. 2007) (Jeremy M.BERG 2002) (Jan Koolman 2005) والنتيجة النهائية لكل دورة هي أكسدة مجموعة الأستيل إلى جزيئين من Co2 وتشكل 3NADH وجزيء واحد من FADH2 كما ينتج جزيء ATP وبما أن الدورة تحدث مرتين لكل جزيء جلوكوز تتضاعف الكميات (4Co2، 6NADH، 2FAD،2ATP) (mader 2007).

سلسلة نقل الالكترونات:Electron Transport Chain

عبارة عن سلسلة من حامل الإلكترونات (Electron Carriers) تقع في المعقدات الجزيئية التي تقع في أعراف المتقدرات حيث تكتسب الإلكترونات من NADH،$FADH_2$ (s.mader 2007) الناتجة عن دورة حمض الستريك ويتم نقل هذه الإلكترونات عن طريق ثلاثة معقدات بروتينية (Respiratory Enzyme Complexes) وحاملي إلكترونات ويسمى المعقد الأول (NADH–Q reductase) ويتم من خلاله نقل الإلكترونات من NADH إلى الحامل الأول (Coenzyme Q) ، ثم تنقل إلى المعقد الثاني (Cytochrome reductase) ، إلى أن تصل إلى حامل الإلكترون الثاني (Cytochrome c) ويليها المعقد الثالث (Cytochrome oxidase complex) الذي بدورة ينقل الإلكترونات إلى جزيء الأوكسجين وبالتالي يتشكل جزيء ماء (josephine S . Modica–Napolitano 2007) فأثناء هذه العملية تتحرر طاقة تستخدم في ضخ البروتون (أيون +H) اي إنه تستخدم المعقدات الطاقة الناتجة عن الأكسدة والاختزال في ضخ أيون الهيدروجين إلى الفراغ ما بين الغشاءين مما ينتج عنه ارتفاع مستوى الهيدروجين أيون في الفراغ المذكور أعلاه مقارنةً بمطرق المتقدرات، وأثناء عملية انتقال أيون الهيدرجين تختزن طاقة وتستخدم بالتالي في تخليق ATP ومما يجدر ذكره أن أعراف المتقدرات تحوي أيضا معقد السنثاز ATP الذي يسمح بإعادة أيون الهيدروجين الى المطرق مما يسبب تخليق ATP من ADP+P ويحدث ذلك بواسطة أنزيم ATP سنثاز (ATP synthase) وتسمى هذه العملية بالتناضح الكيميائي (Chemiosmosis)(BruceA Iberts 2008b) (mader 2007) (Walter 2009) يغادر ATP المطرق بواسطة قنوات البروتين ويبقى في الخلية ويستخدم في العمل الخلوي ويعتبر جزيء الأوكسجين المستقبل الأخير للإلكترونات في السلسلة حيث يرتبط مع أيون الهيدروجين ويشكلان ماء (H2O) (s.mader 2007; Debray et al. 2008). كما أن هناك عملية أيض أخرى تتم في المتقدرات وهي أكسدة الأحماض الدهنية ويتوسطها أنزيمات قابلة للذوبان في مطرق المتقدرات حيث يدخل الحمض الدهني إلى دورة حمض الستريك ويتأكسد إلى ثاني أوكسيد الكربون، وتشير العديد من الدراسات إلى دور المتقدرات في الموت الخلوي المبرمج (Modica–Napolitano et al. 2007).

1-5-3-4. ثانياً. الموت الخلوي المبرمج Apoptosis

تعتبر آلية فسيولوجية لإزالة الخلايا المتحولة تحت تأثير العديد من الأنزيمات لتحطيم الخلية مما ينتج عنه تقطع دنا، وتكاثف الكروماتين وظهور فقاعات على سطح غشاء الخلية و انكماش

الخلية، وتلاحظ أخيرا جسيمات الاستموات ذات الغشاء غير المنتظم تحوي جزءاً من الهيولي مع شدف من عضيات الخلية، ولا يوجد رد فعل التهابي(Poon et al. 2014) (JP Rajguru 2012).

- **هناك طريقتان للموت الخلوي المبرمج داخلي وخارجي :**

تتحكم المتقدرات بالطريق الداخلي للموت الخلوي المبرمج:

يتفعل هذا الطريق بعدة عوامل منها قلة عوامل النمو، والإجهاد stress، والإصابة، تعتمد سلامة الغشاء الخارجي للمتقدرات على العديد من البروتينات من عائلة BCL2 (طلائع الاستموات BAX، BAK)، (ومضادات الاستموات BCL_2،BCLXL)، وهناك مجموعة ثالثةBH_3 (BAD، BID، PUMA) تعمل على التحكم بالتوازن بين بروتينات الاستموات ومضادات الاستموات تحفز هذه المجموعة(BH3) الاستموات وذلك بتثبيط عمل مضادات الاستموات مما يؤدي إلى زيادة نفوذية غشاء المتقدرات ويتسرب السيتوكروم C ويرتبط بدورة APAF1 ويفعل Caspase9 ويليه Caspase3 وبالتالي يتفعل الموت الخلوي المبرمج، فإذا حدث خلل في أية مرحلة من هذه المراحل فيمكن أن تسبب السرطان(Chaabane et al. 2013) (Chaabane et al. 2013; Kalimuthu & Se-Kwon 2013) (Ouyang et al. 2012) (Otera & Mihara 2012).

1-5-3-4. ثالثاً. إنتاج الجدور الحرة:

تلعب الجدور الحرة دوراً أساسياً في العمليات الفسيولوجية ومنها الموت الخلوي المبرمج وآليات الدفاع الخلوي ضد الالتهاب وفي التعبير الجيني والنمو الخلوي G_1/G_2Growth(Alessandra Maresca 2011; Ashok Shinde 2012).

تعرف الجذور الحرة بأنها مكونات كيميائية تفقد إلكتروناً من مدارها الأخير وتعتبر عناصر غير مستقرة وتتفاعل مع العناصر العضوية وغير العضوية مثال على ذلك المواد المتفاعلة الأوكسيجينية (Reactive Oxygen Species ROS) التي تنتج بشكل طبيعي أثناء عملية تنفس المتقدرات وإنتاج الطاقة ولكنها تزال بفاعلية جهاز الدفاع الخلوي، فعندما تزداد عملية إنتاج ROS أو تقل فعالية الدفاع الخلوي تنتج الشدة التنفسية (Jezierska-Drutel et al. 2013) وكنتيجة لذلك تهاجم الحموض النووية، البروتينات، الشحوم، بالإضافة إلى ذلك تتفاعل الجذور الحرة مع مواد داخل الخلية تتحول بدورها أيضاً إلى جذور حرة وتستمر سلسلة التخريب أذ تتفاعل مع مركب الثيامين في الدنا النووي والمتقدري مما ينتج عنه تحطم في الدنا ويؤدي إلى

موت الخلية أو الشيخوخة أو التغيرات الخبيثة (Vinay Kumar 2013)، (Davila & Zamorano 2013) .

هناك العديد من التفاعلات لإنتاج الجذور الحرة نذكر منها ما يلي:

- تفاعل الأكسدة والاختزال:

خلال عملية الاستقلاب والتنفس الخلوي الطبيعي يختزل الأوكسجين بإضافة أربعة الإلكترونات لإنتاج الماء(Gogvadze et al. 2008) خلال هذه العملية تتولد بعض أنواع السموم وذلك باختزال جزيئي الأوكسجين ويعطي فوق الأوكسيد $O_2^{\cdot -}$، بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2، وجذر الهدروكسيل $OH^{\cdot}$، كما أن بعض المعادن مثل النحاس والحديد تكتسب أو تعطي الإلكترون مما يؤدي إلى تحفيز تشكل الجذور الحرة (Vinay Kumar 2013).

- امتصاص الطاقة الإشعاعية(الأشعة فوق البنفسجية، الأشعة السينية)

يتم فيها تحلل الماء إلى جذور حرة الهيدروكسيل، الهيدروجين($OH^{\cdot}$، $H^{\cdot}$).

- الاستقلاب الأنزيمي للمواد الكيميائية الخارجية(Jezierska-Drutel et al. 2013).

- الالتهاب، إذ تنتج بعض الجذور الحرة من الخلايا البيضاء للقضاء على البكتيريا(Ashok Shinde 2012).

- أوكسيد النتريك، ينتج عبر العديد من الخلايا ويعمل كجذور حرة (Vinay Kumar 2013).

آليات إزالة الجذور الحرة من الخلية من خلال أنزيمات وعناصر مضادة للأكسدة:

- يحفز أنزيم ديسموتاز فوق الأوكسيد SOD تحويل فوق الأوكسيد O^{-2} إلى بيروكسيد الهيدروجين وأوكسجين وبالتالي يتحول بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسجين بواسطة أنزيم الكاتلاز.

- بالإضافة إلى ذلك تزال السمية لبيروكسيد الهيدروجين وفوق الأوكسيد المائي بواسطة أنزيم بيروكسيداز الغلوتاثيون الموجود في المتقدرات والعصارة الخلوية، وتتغير مستويات هذه الأنزيمات في الخلايا الورمية السرطانية(Keshav K. Singh 2009).

- مضادات الأكسدة الداخلية والخارجية منها فيتامين(E، A، C، B- Carotene) تعمل على إزالة الجذور الحرة.

تتم إزالة النحاس والحديد بارتباطهما بالبروتين المخزن(ترانسفيرين، فيرتين، لاكتوفيرين، سيرولوبلازمين) وبالتالي تقلل من إنتاج الجذور الحرة(Vinay Kumar 2013).

D-LOOP.4-5-1

تعتبر منطقة D-LOOP البؤرة الساخنة التي تتحكم بالعديد من الطفرات وذلك لاحتوائها على العديد من العناصر المنظمة لنسخ الدنا المتقدري وبالتالي حدوث أي طفرة في هذه المنطقة يؤثر فعلياً في نقص عدد نسخ الدنا المتقدري(Verschoor et al. 2013)، بالإضافة إلى ذلك حدوث طفرات في أحد الجينات المرمزة للسلسلة التنفسية يؤدي إلى زيادة عدد نسخ الدنا المتقدري (Keshav K. Singh 2009) (Modica-Napolitano et al. 2007)

1-5-5. المتقدرات والسرطان : Mitochondria And Cancer

تلعب المتقدرات دوراً محورياً في تنظيم وظيفة الخلايا في السرطان واستقلابها وموتها، وقد لوحظ العديد من التغيرات الهامة في متقدرات الخلايا السرطانية والتي بدورها تساهم في تشكل الورم منها زيادة إنتاج الجذور الحرة، وانخفاض معدل الفسفرة التأكسدية ويرافقه زيادة عملية تحلل السكر (Verschoor et al. 2013)،(Jean-François Dumas 2012b) تعتمد استجابة الخلية للعوامل الضارة على شدة العامل المؤذي ومدته ونوع الخلية المتأذية وقدرتها على التأقلم وخريطتها الورثية (Vinay Kumar 2013).

1-5-5-1.علاقة خلل وظيفة المتقدرات بتشكل السرطانات:

- تشكل الفسفرة التأكسدية في المتقدرات 90 % من إنتاج ATP في الأنسجة الطبيعية بينما الطريق اللاهوائي في الهيولي يشكل 10% من تحليل الطاقة ولكن في حالة السرطان وبسبب التكاثر السريع للخلايا السرطانية وكنتيجة للعديد من التغيرات التي قد تحدث في الخلية السرطانية ومنها انخفاض عدد المتقدرات و تغيرات على التركيب الدقيق للمعقدات البروتينية للفسفرة التأكسدية والسلسلة التنفسية في المطرق وفي الأعراف (Gaude & Frezza 2014) ووجود طفرات في الدنا المتقدري (Jean-François Dumas 2012b) ، ينخفض معدل الATP وذلك لانخفاض مستوى الفسفرة التأكسدية(Tatarkova et al. 2012)،(Higuchi 2012b) وبالتالي تحاول الخلية أن تقوم بالمعاوضة وذلك باستخدام الطريق اللاهوائي لتحليل السكر (نظرية warburge) وهذا يعني أن عملية تحليل السكر في الطريق اللاهوائي ذات دور محوري في التسرطن(Verschoor et al. 2013).

1-5-5-2. دور عامل نقص الأكسدة في تثبيط نشاط المتقدرات(HIF1) -Hypoxia Inducible Factor 1:

- يطلق في المتقدرات ويعمل عامل نقص الأكسدة HIF1 في الخلية السرطانية على تثبيط وظيفة المتقدرات إذ يؤدي إلى اضطراب استقلاب الطاقة في المتقدرات وتعطيل حلقة كريبس، من خلال تداخله في العلاقة المتبادلة بين الفسفرة التأكسدية وتحلل السكر ويتم التحكم بالتحول الحاسم بين تحليل السكر والفسفرة التأكسدية

بواسطه أنزيمين وهما بيروفات دهيدروجيناز (PDH) ولاكتات دهيدروجيناز (LDH) إذ يتم التحكم بنشاط PDH بواسطة بيروفات دهيدروجيناز كيناز 1(PDK1)، وتتم هذه العملية من خلال عامل نقص الأكسدة الذي بدورة يقوم بعدة خطوات منها:(McKinney 2011) (Gogvadze et al. 2008)

- يحرض PDK1 وبالتالي يتوقف عمل PDH ويتم تثبيط حلقة كريبس وآلية التنفس في المتقدرات(Jean-François Dumas 2012b)
- يحفز التعبير المورثي لأنزيم الاكتات دهيدروجيناز فتتحول البيروفات إلى لاكتات ويؤدي ذلك إلى قلة استهلاك البيروفات داخل المتقدرات وبالتالي يقلل مقدرة الآلية التنفسية للمتقدرات(Gogvadze et al. 2008) و يتراكم حمض اللبن فيؤدي إلى ارتفاع الباهاء وينتج عن ذلك تخريب مجموعة من انزيمات الفسفرة التأكسدية .(Davila & Zamorano 2013)

1-5-5-3. ظهور بعض المورثات المسرطنة:

- أظهرت بعض الدراسات أن استقلاب الطاقة في المتقدرات لا يتغير في معظم الخلايا السرطانية لذلك هناك عدة آليات تعزز تحلل السكر في الخلايا السرطانية منها تحريض 10% من مورثة سرطانية oncogene تقود التحول إلى عملية تحلل السكر اللاهوائي وذلك من خلال تحريض عامل استمرار نقص الأكسجة hypoxia-inducible factor (HIF (Michelle L. Boland 2013) على سبيل المثال تلعب كل من مورثة RAS و MYC دوراً في تحفيز تحلل السكر إذ تؤدي إلى زيادة التعبير الجيني لعدة انزيمات في الخلايا السرطانية منها هيكسوكيناز، فسفوفركتوكيناز، وناقلات الجلوكوز (hexokinase or phosphofructokinase and glucose transporters)(Jean-François Dumas 2012b).

-

1-5-5-4. تحفيز سبيل p13k-Akt-Mtor(phosphoinositide 3-kinase)

- يتفعل مسار IP3 في الخلايا السرطانية و AKT المعروف باسم بروتين كيناز B -يشارك في المسار الذي ينقل إشارات البقاء إلى الخلية- وبالتالي يؤدي تفعيله إلى زيادة حجم الخلية والتوجه إلى تحلل السكر اللاهوائي وبالتالي بقاء الخلية حية (Gogvadze et al. 2008) إذ يعمل AKt بشكل غير عادي على تحفيز HIF-1 بظروف أكسجة طبيعية والذي يفعل غالباً عند انخفاض مستوى الأوكسجين وبالتالي يحفز آلية تحلل السكر اللاهوائي من خلال زيادة فعالية االبروتينات المسؤولة عن تحلل السكر ونواقل الجلوكوز وتحلله في السيتوبلازم(Jean-François Dumas 2012a) وبالتالي يؤدي إلى تجنب الخلايا السرطانية على تجنب الموت الخلوي المبرمج وذلك بوقف فعالية (تخميد) Bcl-2 المرتبط مع محفز الموت الخلوي المبرمج Bad وبالتالي توقفcaspase-9 أو بواسطة زيادة تعبيرية عن مضادات الموت الخلوي المبرمج Bcl-2 (Li 2013).

1-5-5-5. دور P53 في تنظيم نشاط المتقدرات:

- على النقيض من المورثات المسرطنة يؤدي تفعيل بروتين p53 الكابحة للورم إلى انخفاض في تحلل السكرglycolytic وزيادة استقلاب الطاقة في المتقدرات ولذلك فإن حدوث طفرة في هذا البروتين يقلل من نشاط السلسلة التنفسية بالمتقدرات وذلك من خلال تقليل بناء مورثة أكسيداز السيتوكروم C (SCO2) المطلوب لأكسيداز السيتوكروم C (COX) للسلسلة التنفسية وبالتالي التقليل منه يؤدي إلى تثبيط آلية عمل السلسلة التنفسية في المتقدرات (Gogvadze et al. 2008) لهذا تعتبر المورثة الكابحة للورم p53(حارسة الجين) المتحكم الرئيسي في التوتر الخلوي، ففي الخلايا السليمة يكون متوسط الحياة له 20 دقيقة وذلك بسبب ارتباطه بالبروتين المعطل له وهو MDM2 ويثبط عمله، ولكنه في الحالات غير الطبيعية يتفعل بواسطة الإشارة غير المناسبة من قبل المورثة الورمية وعوز الأوكسجين أو تحطم الدنا، وبالتالي ينفصل عن البروتين المرتبط به ويزداد متوسط الحياة لديه (Vinay Kumar 2013) ويعمل على

نسخ بروتين p21(CDKN1A) والذي بدورة يمنع فسفرة جين RB (Retinoblastoma) (Li W 2013) مما ينتج عنه إيقاف دورة حياة الخلية عند مرحلة G1-S ، كما يفعل جين GADD45 المسؤول عن إصلاح الدنا فإذا تم الإصلاح تستمر دورة حياة الخلية، وإذا لم يتم الإصلاح يعمل P53 كقادح زناد لإطلاق عملية الموت الخلوي المبرمج أو دخول الخلية إلى مرحلة الشيخوخة، لهذا إذا حدث فقدان أو طفرة بP53 تتوقف هذه الآلية وبالتالي تتكاثر الخلايا المتضررة جينياً مما يؤدي إلى ورم خبيث(Vinay Kumar 2013).

1-5-5-6. طفرات في الدنا النووي المرمز لبروتينات المتقدرات:

- هناك بعض بروتينات المتقدرات المرمزة من قبل الدنا النووي لها القدرة على كبح الورم فحدوث أية طفرة فيها قد يولد بشكل غير مباشر التحلل اللاهوائي للسكر وتشمل أربعة جينات نازعة الهيدروجين السكسينات وهي *SDHB* و*SDHC* و *SDHD* وجين *furmarase FH* ، فالآلية التي تربط المتقدرات بالسرطان تعتمد على الشدة التأكسدية والإشارات الأيضية داخل حلقة كريبس(Jean-François Dumas 2012a). على سبيل المثال إن الطفرات التي تحدث في معقد أنزيم السكسينات دهيدروجيناز succinate dehydrogenase complex وفومارات هيدراتاز fumarate hydratase (يحفزا التفاعل بدورة كريبس) تعطي مؤشراً بنقص التأكسج وبالتالي تحفز HIF على الرغم من توافر الأكسجين بنسب طبيعية والذي بدورة يعمل على تحفيز تحلل السكر ونمو الأوعية الدموية (Modica-Napolitano et al. 2007) كما يرتبط نقص فعالية أنزيم السكسينات دهيدرو جيناز بزيادة إنتاج ROS (Jean-François Dumas 2012a).

1-5-5-7. زيادة إنتاج ROS :

- تعتبر المتقدرات أكثر عرضة للتحطم وذلك لالتصاقها بموضع إنتاج الجذور الحرة والذي يؤدي إلى زيادة تحطم الدنا المتقدري والمسؤول عن بناء العديد من البروتينات الضرورية للسلسلة التنفسية وبالتالي تعطيل نشاط المتقدرات والانزياح إلى تحلل السكر لإنتاج ATP كما أن له دوراً في استقرار HIF-1 وتفعيله تحت ظروف نقص الأوكسجين، ينصب عملة إلى جانب المورثات المسرطنة مما يؤدي إلى تفعيل شاذ للـHIF وبالتالي تكون الورم (Lee & Wei 2009).

الباب الثاني

المواد والطرائق

2-1.عينة البحث

تمت هذه الدراسة بالتعاون بين كلية طب الاسنان وهيئة التقانة الحيوية قسم البيولوجيا الجزيئية كما تم جمع العينات بالتعاون مع مستشفى المجتهد ومستشفى المواساة.
يتألف مجتمع الدراسة من مرضى آفات سرطانية ومرضى آفات محتملة الخباثة وحالات الشاهد، بُنيت الدراسة على عينات لعاب، حيثُ أُخذت 58 عينة من كلا الجنسين (ذكور، إناث) على مدار سنةٍ ونصف (أيار2013-كانون الأول2014) راجعوا قسم طب الفم كلية طب الأسنان جامعة دمشق ومشفى المجتهد ومشفى المواساة. ضمّت مجموعة الدراسة 17 مريضاً (سرطاناً شائك الخلايا في الحفرة الفموية)، و21 مريضاً (طلاوةً بيضاء)، و20 شاهداً وتراوحت أعمار المرضى بين24-82عاماً. تمَّت مقابلة المرضى المشاركين في الدراسة لتعبئة نموذج استبيان مخصوص يشمل(الاسم، الجنس، العمر، رقم الهاتف، القصة المرضية، تناول الأدوية، تقصي الأمراض العامة إن وجدت، .....)، وأُجري الفحص السريري للفم والفكين والأسنان، وعند توافر شروط الدراسة لدى المريض تمَّ الحصول على الموافقة المستنيرة مكتوبةً وموقعةً من قبلهم جميعاً(انظر الملحق).

2-1-1. طريقة أخذ العينة

- يطلب من المريض المضمضة بماء معقم خال من الشوارد مرتين .
- الانتظار 10 دقائق قبل بدء البزغ في عبوة معقمة.
- يستمر المريض بالبزغ أيضاً 10 دقائق إلى أن يصل مستوى اللعاب 1000 ميكروليتر.

2-1-2. معايير اختيار العينة:

تصميم التجربة: Matching – Case- Control

- التمتع بحالة صحية جيدة (عدم وجود أمراض جهازية عامة كأمراض المناعة الذاتية مثل الذئبة الحمامية، وبعض الحالات الالتهابية المزمنة مثل التهاب الكبد الوبائي، والتهاب البنكرياس الحاد، احتشاء عضل القلب والسكري).
- أن يكون عمر المرضى 20 عام ومافوق.
- يقبل المرضى سواء كان من المدخنين او غير المدخنين.
- إعتماد نتيجة التشريح المرضي لتصنيف العينات.
- عدم وجود رض حاد في الفم Trauma قبل فترة وجيزة.
- مجموعة الشاهد غير مصابين بأي حالة ورمية سابقة سواء كانت في الفم أم أي عضو آخر.
- تؤخذ عينات اللعاب من المرضى قبل العمل الجراحي.
- مراعاه أخذ العينة في الصباح الباكر حيث يكون المريض صائماً.

2-2. مواد البحث

2-2-1. العتائد Kits

جدول(2-1) العتائد المستخدمة في البحث

Invisorb ®spin forensic kit	كيت عزل الدنا	Stratec molecular (Invetik), Germany
Dream Taq PCR Master Mix(2x)	كيت تفاعل البوليمراز التسلسلي	Thermo Scientific, (EU) Lithuania
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	كيت عزل الدنا من الدم	Thermo scientific, (EU) Lithuania
Exosape	كيت تنقية ناتج تفاعل البوليمراز التسلسلي	Affymetrix, USA
Big dye direct cycle sequencing kit	كيت سلسلة نواتج التفاعل	Applied biosystem
KAPA Probe Fast qpcr kit Master Mix (2x) Universal	كيت تفاعل البوليمراز التسلسلي للمتابعة اللحظية	Kapa biosystems, USA

2-2-2. المشارع والمسابير Primers And Prope

مشارع الدنا المتقدري mtDNA ($HmitoF_5$-$HmitoR_5$) ومشارع الدنا النووي ncDNA (HB_2MF_2-Hb_2MR_2) والمسابر (HB2MP2،Himtop5) المصنع من شركة (VbC Biotech,Vienna).

2-2-3. المواد الكيميائية Chemical Substance

جدول(2-2) المواد الكيميائية المستخدمة في البحث

Absolute Ethanol	كحول مطلق	Roth 99.9%, Germany
Agrose LM	آغاروز بودرة	Sigma, USA
Tris Acitate EDTA TAE Buffer	دارئة	Sigma, USA
Ethedium bromide 10mg/ml	إيثديوم برومایاد	Roth, Germany
6× Orange Loading Dye Solution	صبغة	Fermentase, Lithuania
GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder	سلم	Fermentase, Lithuania

2-2-4. الأدوات Tools

جول(2-3) الأدوات المستخدمة في البحث

Single-channel micropipettes	ممص ميكروني بقناه واحدة	Eppendorf, Germany
Filtered pipette tips	رؤوس ممصات معقمة ومفلترة	Avant Guard, USA
Safe-lock tube 0.5&1.5ml	انبوب بحجم محكم الاغلاق معقمة	Qiagen, Germany
PCR tubes 0.2ml	انبوب تفاعل البوليمراز التسلسلي بحجم	Qiagen, Germany
Glass beakers, flasks, Cylinders glassware	دورق- حوجلة-ادوات زجاجيةمخروطية الشكل	Fisher Scientific, USA
Multiple-functions Dental Devices Kit	عنيدة ادوات كتعددة الاستخدامات السنية	HSR Primo Export, UK
Powder-free gloves, sterile water, aseptic packaging		

2-2-5. التجهيزات Equipment

جدول(2-4) الأجهزة المستخدمة في البحث

ABI prism 3100 avant genetic analyzer	جهاز تحديد النوكليوتيدات	Applied biosystem,USA
Multiplex Quantitative PCR System,Mx 3005	جهاز تفاعل اللحظي	Stratagene, USA
conventional PCR System		PeQlab, UK
8" TFT LCD Color Monitor	جهاز تصوير توثيق الهلام مع كاميرا وصفيحة الاشعة البنفسجية من شركة	Canon, china
Horizontal Electrophoresis system	جهاز الرحلان الآفقي	GENEI, India
Centrifuge 14,800 rpm	مثفلة بسرعة	Herolab, Germany
PCR	مثفلة	Kendro, Germany
Biofuge Centrifuge		
Biohazard safety cabinet	خزانة عمل عقيم لتحضير التفاعل	JSR, Korea
PH/ORP Meter	مقياس درجة الحموضة	Spceomark, china
Nano drop	لقياس تراكيز العياري	Nanodrop technologies,Inc(USA)
Thermo Mixer comfort	خلاط حراري	Julabo, Germany
Vortex Mixer	هزاز	Biosan, Eu
Microwave	ميكرو واف	LG, Gordon

2-2-6. البرمجيات software

جدول(2-5) البرمجيات المستخدمة في البحث

NCBI Blast tool	NCBI, USA
NCBI Nucleotide data base	NCBI, USA
Pimer3	University of Tartu, Estonia
DNA/RNA Copy Number Calculator	www.EndMemo.com

2-3. طرائق الدراسة Study Methods

2-3-1. إختيار البادئات Primers Selection

تمَّ انتقاء البادئات التي حققت المعايير التالية:

- تمَّ من خلالة تحديد عدد نسخ mtDNA وذلك من خلال مضاعفة منطقة فريدة قصيرة من mtDNA ولاتوجد كجينة كاذبة في الدنا النووي(nuclear genome).
- تمَّ تحديد المحتوى النووي من الدنا من خلال مضاعفة قطعة فريدة في المجين النووي ولا يوجد مثيل لها فيmtDNA. (Afshan N. Malik 2011) .
- تضخم منطقة محافظة Conserve أي أنه لايحدث فيها طفرات.
- اعتمادها في طواقم تجارية جاهزة.
- استخدامها في مختلف أجهزة الدوار الحراري Thermal cycler التي تعتمد مبدأ المتابعة اللحظية للتفاعل التسلسلي للبوليميراز Real-time PCR.

2-3-2. حل البادئات والمسابرPrimers & Probe

- تكون البادئات والمسابر التي تم شراؤها على شكل مسحوق مجفد أبيض اللون ويوجد كل منهما في أنبوب خاص يكتب علية تسلسل هذا البادىء والمسبر، كما يرفق كل منهما بنشرة تحوي التسلسل النوكليوتيدي، وعدد الأسس فيه، وقد تمّ حل البادئات والمسابر بالماء المعقم حسب بروتوكول الشركة الصانعة إلى أن نصل إلى التركيز المطلوب(9µM) للبادئات و(2.5µM) للمسابر.

جدول(2-6) التسلسل النوكليوتيدي للمشارع والمسابير المستخدمة في البحث

Gene accession no	Primer/probe	Oligonucleotide sequence	Product size (bp)
Human mitochondrial genome NC_012920	Pri-hmito F5	CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC	65
	hmMito R5	GCTGGTGTTAGGGTTCTTTGTTTT	
	PRO-hmito P5	FAM-ATCTCTGCCAAACCCC	
Humanb2M Accession number M17987	Pri-hB2M F2	GCTGGGTAGCTCTAAACAATGTATTCA	95
	hB2M R2	CCATGTACTAACAAATGTCTAAAATGGT	
	pro-hB2M P2	JEO-CAGCAGCCTATTCTGC	

2-3-3. عزل الدنا المتكامل Total DNA من العينات السريرية :

أُخذت عينة لعاب بمقدار 500ميكروليتر تمَّ عمل تثفيل بقوة 1600Xg لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة اربعة درجة مئوية، تمَّ فصل الطافي عن الراسب(200ميكرون) وضعَ الراسب بأنبوب 1.5مل معقم.

- تمّ عزل الدنا من العينات السريرية التي تمّ جمعها من المرضى والمحفوظة بدرجة حرارة 80 °C باستخدام طاقم عزل الدنا من اللعاب Invisorb ®spin forensic kit من شركة(Stratec molecular (invetik), Germany) تمّ تشغيل جهاز (Thermo mixer) الى ان تصل درجة الحرارة 56 °C و تثبيتها على ذلك.
- حُضِنَ محلول الشطف120(Elution buffer) في Thermo mixer بدرجة حرارة 56 °C منذ بداية العزل .
- أُخذت عينة من اللعاب بمقدار 500 ميكروليتر، يثفل الانبوب بسرعة 1600×g بدرجة حرارة 4 °C لمدة عشر دقائق (Centrifuge at 1600 **g** 4c for 10 minute)، يتم فصل الطافي(أُخذ 300 ميكروليتر) عن الراسب يوضع الراسب (200 ميكروليتر) بأنبوب معقم 1.5 مل يضاف الية التالي (100 ميكرون lysis buffer M ، 100ميكرون ddH2O، 20 ميكرون carrier RNA ، 10 ميكرون Proteinase K).
- حُضن المزيج في Thermo mixer بدرجه حرارة 56 °C مدة 10 دقائق.
- تمّ اضافة 200 ميكرون Binding Buffer B6 الى العينة وتمّ المزج بشكل تامّ من الاعلى الى الاسفل اربع مرات متتالية بواسطة pipetting .
- ضُمّ أنبوب الجمع collection tube مع الأنبوب الىRTA Spin Filter ، وأضيف المزيج لهذا الأخير ثم التثفيل بسرعة 13.000 g لمدة دقيقة واحدة.
- تمّ اضافة 300 ميكرون Washing buffer 1 ثم تمّ التثفيل 30 ثانية بسرعة 13.000 g .
- تمّ التخلص من RTA Receiver tube، وضِعَ الفلتر ب RTA Receiver tube جديد .

- تمّ اضافة 600 ميكرون washing buffer 2 عُمِل له تثفيل بسرعة 13.000 g 30 ثانية. و من تمّ رمي أنبوب الجمع ومحتواه، واستبداله بأنبوب جمع جديد 2 مل الذي يشمله الطاقم .
- تمّ عمل تثفيل ب 13.000g لمده دقيقتين لإزالة الرواسب المتبقية من الايثانول .
- وضِع الفلتر في 1.5 مل Receiver Tube يضاف لها 60 ميكرون من Elution buffer تمَّ الحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .
- تمّ عمل تثفيل 6.000×g لمدة دقيقة واحده تمّ مزج الخلاصة جيداً (Extract) ومن تمّ حفظها في المجمدة 20 °C-.

شكل(2-1) مكونات طاقم عزل الدنا المتوفر في مركز التقانات الحيوية

2-3-4. تحضير العياري Standard Preparation

- تمَّ عزل DNA من عينة دم باستخدام طاقم عزل DNA (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermoscientific,(EU) Lithuania)،
- تمّ تحضير انابيب 1.5 مل ويكتب عليه تاريخ استخلاص العينة ورقم المريض ونوع العينة،
- أُخذت عينة من الدم بمقدار 500 ميكرون، يثفل الانبوب بسرعة 1600g بدرجة حرارة 4°C لمدة عشر دقائق (Centrifuge at 1600 **g** 4c for 10 minute)، يتم فصل الطافي(نأخذ 300 ميكرون) عن الراسب يوضع الراسب (200 ميكرون) بأنبوب مكتوب علية Total DNA ،
- تمّ تشغيل جهاز (Thermo mixer) حتى تصل درجة الحرارة 56 °C و تثبيتها على ذلك.

- حُضن محلول الشطف(Elution buffer) في Thermo mixer بدرجة حرارة 56 °C منذ بداية العزل .
- تمّ أخذ 200 ميكرون من عينة الراسب ونضعها بأنبوب معقم بحجم 1.5 مل ونضع عليها 400 ميكرون من محلول الحل (lysis solution)، 20 ميكرون برتيناز proteinase (k) وتمّ المزج بشكل تامّ.
- حُضن المزيج في Thermo mixer بدرجه حرارة 56 °C مدة 10 دقائق.
- اضافة 200 ميكرون ايثانول بدرجة نقاوة (96– 100)، وتمّ المزج بشكل جيد .
- ضُمّ أنبوب الجمع collection tube مع الأنبوب المفلتر filter tube، وأضيف المزيج لهذا الأخير.
- تمّ التثفيل لمدة دقيقةً واحدة بسرعة g6000 (centrifuge 1 minute at 6000 g) ومن تمّ رمي أنبوب الجمع ومحتواه، واستبداله بأنبوب جمع جديد 2 مل الذي يشمله الطاقم .
- اضافة 500 ميكرون من دارِئَة الغسل 1 (washing buffer 1) يُعمل له تثفيل لمدة دقيقة واحدة بسرعة 8000 g (at 8000g centrifuge 1min) ، ومن تمّ رمي أنبوب الجمع ومحتواه .
- اضافة 500 ميكرون من دارِئَة الغسل 2(washing buffer2) الى الأنبوب المفلتر filter tube يليه تثفيل 3 دقائق بسرعة g12000 (centrifuge 3 min at 12000g)، تمّ رمي أنبوب الجمع واستبداله بأنبوب جديد.
- اعادة التثفيل دقيقة واحدة بنفس السرعة للتخلص من البقايا العالقة، من تمّ رمي أنبوب الجمع ومحتواه .
- ضُم أنبوب تثفيل ميكروي microcentrifuge tube جديد سعة 1.5 ml مع الأنبوب المفلتر ذاته، وأضيف لهذا الاخير مقدار 50 ميكرون دارئة الشطف(Elution buffer) في مركز الأنبوب المفلتر يحتضن لمده دقيقتان بدرجة حرارة الغرفة.
- تمّ التثفيل بسرعة g8000 مدة دقيقة واحدة (centrifuge 1 min at 8000 g).
- تمّ مزج الخلاصة جيداً (Extract) ومن تمّ حفظها في المجمدة 20– °C.

2-3-4-1. تحضير سلسلة تفاعل البلمرة للعياري Standard PCR Preparation

- تمّ عمل تضخيم بواسطة تفاعل PCR باستخدام طاقم PCR من شركة(Thermo Scientific, EU Lithuania) يحفظ هذا الطاقم بدرجة حرارة −20C°، وذلك باستخدام مشارع الدنا المتقدري MtDNA (hmitoF$_5$− hmitoR$_5$) ومشارع الدنا النووي nucDNA(hB$_2$MF$_2$−Hb$_2$MR$_2$) المصنع من شركة (VbC Biotech,Vienna)، تمّ عمل عينتين للدنا المتقدري وعينتين للدنا النووي وفقاً لما يلي:
- تمّ تحضير أنبوبين معقمين 1.5 مل يكتب على إحداهما nuc DNA و الآخر mtDNA.
- إضافة الماء لكليهما(17 ميكروليتر لكل أنبوب).
- تمّ إضافة مبدئات primer الخاصة nucDNA (2 ميكروليتر) في الأنبوب الخاص به وكذلك مبدئات mtDNA.
- إضافة 12.5 ميكروليتر من Master mix لكلا الأنبوبين، تمّ المزج جيداً.
- تمّ تحضير 4 أنابيب بحجم 0.5 مل(PCR tube) يكتب على رأس الغطاء N,M.
- تمّ توزيع 23 ميكروليتر من الخليط لكل أنبوب.
- تمّ إضافة 2 ميكروليتر من الدنا لكل أنبوب ليصبح إجمالي تفاعلPCR 25.
- تمّ وضع العينات في جهاز PCR.

جدول (2-7) كمية مواد التفاعل

المادة	الكمية لعينة واحدة	إجمالي الكمية لعينتين N/M
Master mix	12.5ml	25
Primer R 0.5 Mm	1ml	2
Primer F 0.5Mm	1µl	2
DNA	2µl	4
H2O	8.5ml	17

- تتم برمجة جهاز PCR بتشغيله أولا بالضغط على زر program ويليه new تمَّ برمجة اسم القائم بالعمل وضبط درجة الحرارة كما يلي:

جدول(2-8) برنامج الدورات الحرارية المتّبع لتفاعل PCR

Program	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extension	Final extension
Cycle	1	40			**1**
Target temperature	95 °C	95°C	60 °C	72 °C	**72° C**
Incubation time	3Min	30 S	30 S	30 S	**7Min**
Analysis mode	None	**Quantification**			

- استمر التفاعل 40 دورة لمدة ساعة وأربع وأربعين دقيقة.

شكل(2-2) جهاز PCR والدورات الحرارية المتبعة لتحضير العياري المتواجد في مركز التقانات الحيوية

2-3-4-2. تمَّ ترحيل العينات للتأكد من دقة عصابة الدنا :

تحضير محاليل ودارئة الرحلان:

أولاً : لابد من تحضير EDTA

تمّ تحضير 250مل EDTA بتركيز 0.5 ميكرو مولار وذلك حسب الخطوات التالية:

- تمّ وزن 46.52 ملغ EDTA من شركة USB (corboration, clevand,oh,USA)، وحلها بجزء من الماء المقطر.
- تمّ وضعها في جهاز مقياس درجة الحموضة PH/Meter لا يحدث الانحلال حتى يتم تعديل درجة الباها PH إلى 8 بإضافة قطرات من NaOH 1 نظامي، ثم تكمل بالماء المقطر إلى الحجم المطلوب.

شكل(2-3) جهاز مقياس درجة الحموضة الموجود في مركز التقانات الحيوية

ثانياً: تحضير 500 مل TAE

- تمّ وزن 121 غراماً من مادة Tris base من شركة promega، و28.55غراماً من Glacid acitation بتركيز 0.5 ميكرو مولار من شركه USB (corboration,clevand,oh,USA).
- حُلت المساحيق السابقة بجزء من الماء المقطر ثم أضيف 50 مل من EDTA الى ان يصل الى 50x ودرجة باها PH=8 ليتم الحفظ.

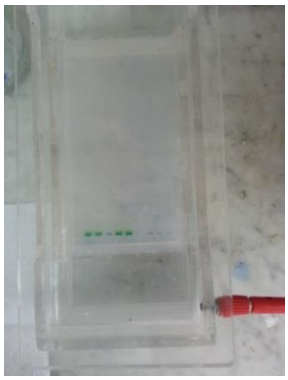
- تمت إضافة ماء مقطر تدريجياً إلى أن وصل الحجم النهائي إلى 500 مل مع استمرار عملية الذوبان على Hot plat.

ثالثاً: الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز LM 2% في دارئة 50X TAE

تمّ استخدام جهاز الترحيل الأفقي، ينظف حامل الهلامة ويمسح بالميتانول ويثبت بعد ذلك حامل الهلامة في حوض الترحيل ويوضع المشط تمهيداً لصب الهلامة.

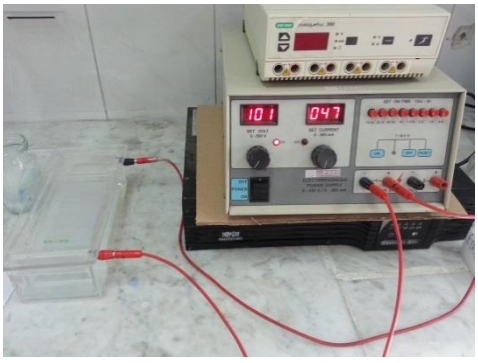
➢ **تحضير الهلامة:**

- يحتاج تحضير الهلامة إلى 100 مل من محلول الآغاروز2% الذي يُحضر كما يلي:
- يُحل 2غ من الآغاروز في عبوة زجاجية سعة 500 مل تحوي 100مل محلولاً يتألف من 2 مل من دارئة TAE 50X و 98 مل ماء مقطراً، ثم توضع العبوة الزجاجية في الموصَدَة (Autoclave) حتى الانحلال التام حيث يصبح المحلول شفافاً تماماً، عندها تخرج العبوة الزجاجية من الحمام المائي وتترك جانباً حتى تنخفض درجة الحرارة إلى 65 °C، تمَّ بعدها إضافة 4 ميكرونات Etidium bromide، يصب محلول الآغار في حامل الهلامة الذي جهز سابقاً ويترك حتى يبرد و يتهلم.
- عندما يبرد الآغار ويتهلم تماماً ينزع المشط بلطف وبشكل عمودي ثم ينقل الهلام إلى حوض الرحلان حيث تغمر الهلامة بدارئة TAE 50X تمّ تحضيرها من 8 مل TAE و492 ماء مقطراً.
- لحقن العينات في الآبار يُمزج 8 ميكرونات من حجم العينة مع 2 bromophenol blue في أنبوب أبندروف، تخلط جيداً ثم تحقن بواسطة Micropipite في البئر المناسب كما في الشكل التالي.

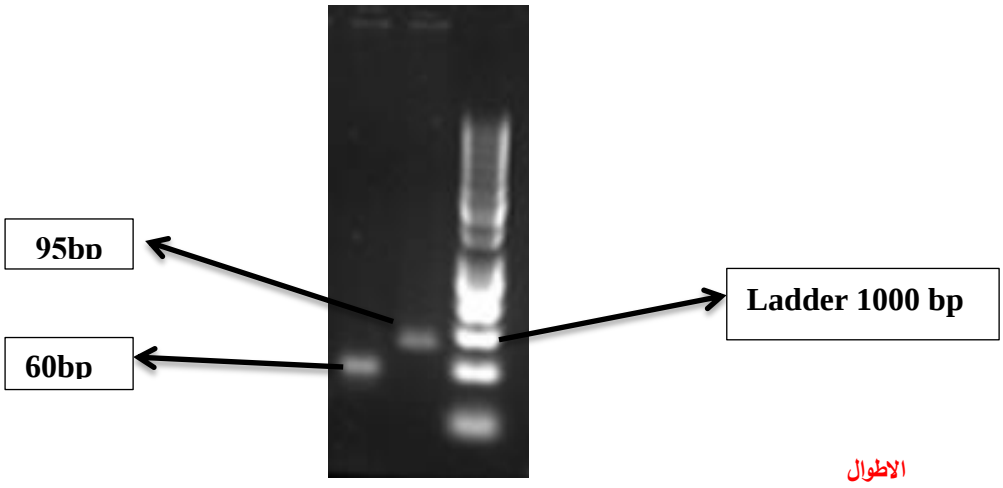


شكل(2-4) حقن العينات في هلامة الآغاروز

- كذلك يتم حقن 2 ميكروليتر من bp1000 DNA ladder، وبالتالي يمكننا معرفة الوزن الجزيئي الذي حصلنا عليه للتأكد من ارتباط المبدء بمكانة السليم.
- عند انتهاء الحقن يتم توصيل جهاز الرحلان إلى تيار كهربائي فيضبط التيار على 100فولط وتسجل شدة التيار الموافقة بالملي أمبير ويتم الترحيل لمدة ساعة ويكون الرحلان بشكل أفقي. وعند الانتهاء يتم اظهار العصابات بوضع الهلامة في جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV ويتم تصوير الهلامة بعد ذلك.



شكل(2-5) جهاز الرحلان الكهربائي في مركز التقانات الحيوية



شكل(2-6) عصابات الدنا وتظهر حزمة واحدة. 95 الدنا النووي المضخم و65 الدنا المتقدري المضخم

2-3-4-3. تنقية العياري Standard purification

تمّت التنقية بواسطة طاقم Exosap يتشكل من أنزيمين يتفعلان بدرجة حرارة 37 C° ويتوقفان عن العمل بدرجة حرارة 80 C° وبالتالي تم التخلص من DNTP وإزالة االبادئات و Tag و Mg .ذلك بوضع مادة Exosape المصنعة من شركةAffymetrix, USA في ناتج تفاعل PCR (PCR product)، اذ انه حسب بروتوكول الشركة الناظمة يضاف 2 ميكروليتر من مادة Exosape إلى 5 من ناتج تفاعل البوليمراز التسلسلي ولذلك تمت إضافة 6.8 من الطاقم إلى الكمية المتبقية من ناتج تفاعل PCR(17) لكل أنبوب، وبالتالي حضنت العينات بدرجة حرارة 37 C° بجهاز PCR لمدة ربع ساعة حسب برتوكول الشركة المصنعة.

2-3-4-4. عملية السلسلة Sequencings

تمَّ عمل sequencings للتأكد بأن الشذف المضخمة هي نفسها الشذف الهدف المراد الحصول عليها بإستخدام عتيدة Big dye direct cycle sequencing من شركة Applied biosystem :

- تحضير الكواشف: اضف ايتانول مطلق إلى عبوة wash buffer –ازرق حسب الكمية المثبته على العبوة.

- **طريقة العمل:**
- في أنبوب إبندروف 1.5 ml : تم إضافة 500ml من binding buffer ، تم إضافة 100ml من ناتج الpcr إذا كان أقل من 100 ml اكمل الحجم إلى 100 مكمل بالماء وغذا كان أكبر من 100 يتم التجزئة.
- تم المزج جيدا ونقل الى الانبوب المفلتر .
- تم التثفيل 30-60 على اقصى سرعه وارم السائل.
- تم اضافة 500ml من wash bufferوتم التثفيل إلى اقصى سرعة13000rct وارم السائل.
- تم اضافة 200 ml من wash buffer وتفل الى اقصى سرعه 13000rct وارم السائل وانبوب الجمع.
- تم استخدام انبوب ابندروف جديد1.5 ml تم اضافة 50elution buffer وتم التثفيل بسرعة 8000rct

- تفاعل cycle sequencing باستخدام كيت Big dye direct cycle sequencing من شركة Apply biosystem الامريكية على جهاز دوار حراري master cycler pros من شركة ابندروف الالمانية حيث تم استخدام المكونات التالية:

7 ml ماء، 5 x buffer 1 ml ، premix 4 ml ، primer DNA 1ml

3. تنقية الناتج باستخدام كيت Dye Ex Qiagen :

رج vortex انبوب spin column لتفريغ كافة الهواء منة، وضع انبوب spin column في انبوب الجمع ، تم التثفيل 3 دقائق بالسرعة القصوى، تم نقل spin tube الى انبوب تثفيل نظيف، تم اضافة مكونات تفاعل السلسلة 10-20ml ، تم التثفيل 3 دقائق باقصى سرعة، تجميع محتوى التنقية من الدنا.

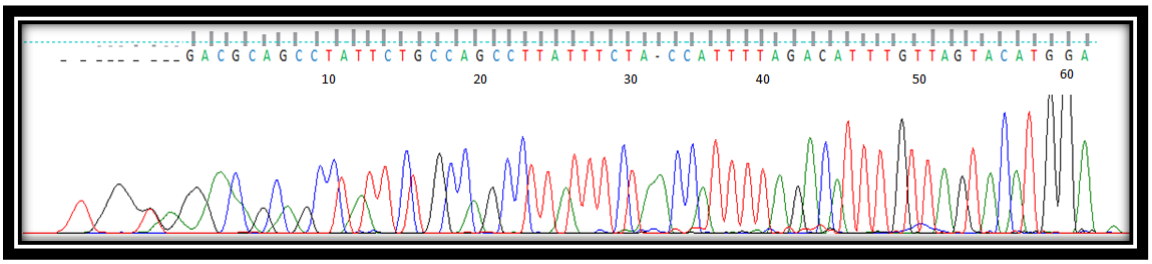
4. ترحيل نواتج التفاعل على جهاز sequence بجهاز ABI Prim 3100-Avant Genetic Analyzer من شركة Applied Biosystem يجفف تماما على concentrator

AB HI DI Formamide ml 15 اضافة ، لمدة 20 دقيقة c°45 plus Eppendor f

تسخين على الدوار الحراري C95 ° 5 تبريد مباشر وتم وضعة على الجهاز.

- **واستطعنا نحصل على التسلسل التالي:**

مثال: التسلسل الناتج عن الشذف المراد تضخيمها في الدنا النووي حيث كانت 94 نوكليوتيد فالجهاز لم يستطع قراءة إلا 60 نوكليوتيد ولكن من خلال 60 نوكليوتيد تمَّ عمل سلسلة في برنامج NCBI,BLAST وبالتالي حصلنا على نسبة تطابق 99%، تمَّ عمل نفس العملية للشذف الخاصة بالدنا المتقدري.



شكل(2-7) التسلسل الناتج عن الشذف المراد تضخيمها في الدنا النووي 60 نوكليوتيد

- تمَّ قياس ناتج التنقية بجهاز Nanodrop (مستشفى الأسد الجامعي).

شكل(2-8) جهاز Nanodrop المتوفر في مشفى الأسد الجامعي

جدول(2-9) ناتج قياس جهاز Nanodrop لعيار كل من mDNA أو nDNA

Name	Conc	Unit
Std n DNA	417	ng/µl
Std m DNA	414	ng/µl

- إذ كان الناتج بوحدة نانوجرام/ ميكروليتر لهذا لابد من تحويلها إلى عدد نسخ
- تمّ تحويل هذه الواحدة إلى عدد النسخ/ميكروليتر (copies/µl)،
- إذ تمَّ استخراج التسلسل النوكليوتيدي للجين المطلوب من موقع http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920
- ونسخة إلى موقع primer 3
- http://primer3.ut.ee/cgi-bin/primer3/primer3web_results.cgi ،
- تمَّ إضافة التسلسل النوكليوتيدي المراد تضخيمه للـ(F primer,R primer)،
- بعد الحصول على القطعة المراد تضخيمها تم نسخها إلى موقع الحساب http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php ، وبالتالي تمَّ تحويل الواحدة من نانوجرام/ميكرو ليتر إلى عدد النسخ/ ميكرو ليتر .

- **حساب عدد النسخ لعياري الدنا المتقدري mtDNA std**

- استخراج التسلسل النوكليوتيدي للجين NCBI

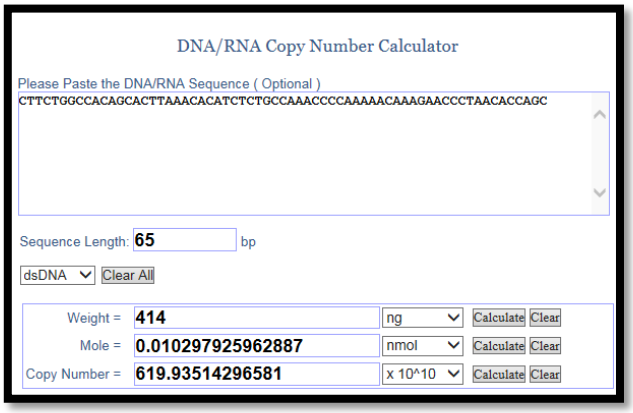
(Homo sapiens mitochondrion, complete genome, NCBI Reference Sequence :NC_ 012920.1, product size 65)

```
301 AACCCCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAA
                    >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>                  <<<

361 ACAAAGAACCCTAACACCAGCCTAACCAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATGCAC
    <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

الشكل(2-9) التسلسل النوكليوتيدي للقطعة المراد تضخيمها في الدنا المتقدري والمتاح من المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI

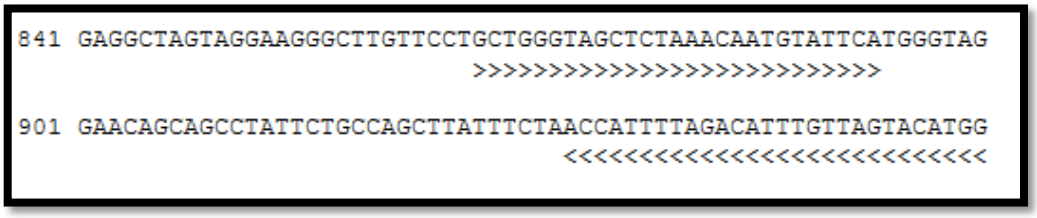
- ادخال التسلسل النوكليوتيدي المراد تضخيمه إلى موقع الحساب Calculator:



الشكل(2-10) واجهة برنامج DNA/RNA Copy Number Calculator لحساب عدد copy number لعياري المتقدرات

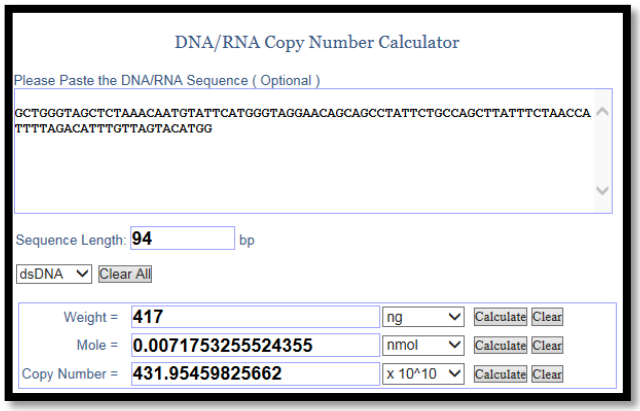
- حساب عدد النسخ لعياري الدنا النووي nucDNA std

(Homo sapiens beta-2-microglobulin(B2M) gene, exons 2,3,4,and complete cds ,GenBank: M17987.1, product size (95



الشكل(2-11) التسلسل النوكليوتيدي للقطعة المراد تضخيمها في الدنا النووي والمتاح من المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI

- إدخال التسلسل النوكليوتيدي المراد تضخيمه الى موقع الحساب Calculator:



الشكل(2-12) واجهة برنامج DNA/RNA Copy Number Calculator لحساب عدد copy number لعياري النواة

جدول(2-10) عدد النسخ/ ميكروليتر لعياري كل من m DNA أو n DNA

Name	No of copy	Unit
Stock Std m DNA	6.2×10^{12}	copies/µl
Stock Std n DNA	4.3×10^{12}	copies/µl

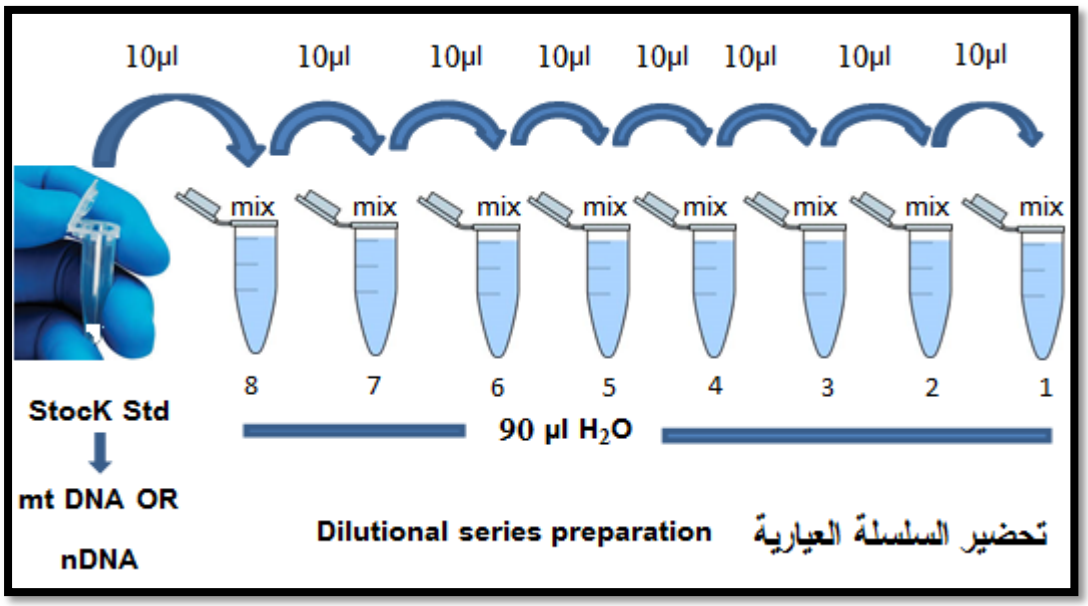
2-4-4-5. تحضير السلسة العيارية Dilutional series preparation

بدءاً من خلاصة الدنا(blood DNA) النقية الناتجة، تمَّ تحضير 8 تمديدات serial 10-fold dilution مرّةً واحدةً فقط تكفي لجميع الاختبارات وذلك باستخدام الماء المعقم

sterile ثنائي التقطير double distilled الخالي من Nuclease، ثمَّ توزيعها وحفظها في المجمدة −20 °C.

➢ **طريقة التمديد:**

- تمّ تحضير 8 أنابيب معقمة بحجم 1.5 مل لكلّ من Std m DNA, Std n DNA ويكتب على غطاء الأنبوب (نوع العياري، رقم الأنبوب من التركيز الأعلى للأقل).
- تمّ توزيع 90 µl من الماء المعقم لكل أنبوب.
- أُخذ 10µl من العياري (Stock StdM, StdN) بعد المزج جيداً تمَّت إضافتة إلى أنبوب رقم(8) الحاوي على 90µl ماء ليصبح التركيز (6.2×10^{11}) لعياري الدنا المتقدري و (4.3×10^{11}) لعياري الدنا النووي إذ تمَّ المزج جيداً.
- تمّ إعادة العملية بأُخذ 10µl من أنبوب رقم (8) وأُضيف إلى أنبوب رقم (7) وتمَّ المزج جيداً، تمّ الاستمرار في التمديد بالآلية نفسها إلى الأنبوب رقم 1 حيث يصبح تركيز العياري للدنا المتقدري(6.2×10^{4}) وتركيز العياري للدنا النووي(4.3×10^{4}).



شكل(2−13) طريقة تحضير سلسلة العياري لكل من (mt DNA و nuc DNA)

جدول(2-11) سلسلة تمديدات العياري لكل من الدنا المتقدري والدنا النووي.

Serial dilution	nDNA	mDNA	UNIT
8	4.3×10^{11}	6.2×10^{11}	Copies/µl
7	4.3×10^{10}	6.2×10^{10}	Copies/µl
6	4.3×10^{9}	6.2×10^{9}	Copies/µl
5	4.3×10^{8}	6.2×10^{8}	Copies/µl
4	4.3×10^{7}	6.2×10^{7}	Copies/µl
3	4.3×10^{6}	6.2×10^{6}	Copies/µl
2	4.3×10^{5}	6.2×10^{5}	Copies/µl
1	4.3×10^{4}	6.2×10^{4}	Copies/µl

2-3-5. تحديد الشروط المثلى Optimization

على الرغم من اقتباس البادئات من مقالة طبية كان لابدّ من تحديد الشروط المثلى Optimization لتفاعل Real Time PCR دون اعتماد الشروط Conditions الواردة في تلك المقالة وذلك لاختلاف الأجهزة Thermal cyclers والطواقم التجارية Kit المستخدمة فيها عن تلك التي استخدمناها في دراستنا.

أجريت اختبارات تحديد الشروط المثلى optimization باستخدام DNA المعزول من الدم بشكل يحقّق قيمة لدورة التضخيم (CT) تتراوح بين 25-35 واستُخدم لذلك الطاقم، أُجريت اختبارات تحديد الشروط المثلىoptimization باستخدام DNA المعزول من الدم بشكل يحقّق قيمة لدورة التضخيم (CT) تتراوح بين 25-35 واستُخدم لذلك الطاقم

KAPA Probe Fast qpcr kit Master Mix(2x) Universal من شركة biosystems, USA، الذي يحتوي معظم مكونات التفاعل بما يشمل تركيز كلور المغنزيوم concentration $Mgcl_2$، ويبقى على الباحث تحديد القيم الفضلى لتراكيز البادئات primers concentration ، والمسابرprobe، وحجم الدنا المرصافDNA Template ودرجة حرارة التلدين annealing temperature. عُدَّت القيم المثلى optimized conditions لكل من هذه المعالم parameters تلك التي تحقق أخفض قيمة CT (إذ CT هي رقم دورة التضخيم amplification cycle number التي يبدأ عندها المنحني بطور log-linear phase)، وأعلى قيمة لشدّة التألق fluorescence intensity، وأشدّ انحداراً للمنحني steepest curve slope .

2-3-5-1. اولاً: تحري القيمة المثلى لدرجة حرارة التلدين برنامج PCR :

تمّ التحرّي عن القيمة المثلى لدرجة حرارة التلدين annealing temperature أذ تمَّ رفع القيم وخفضها، مع تثبيت قيم البرنامج الأخرى الواردة في الجدول التالي.

جدول(2-12) قيم درجة حرارة التلدين التي تمَّ اختبارها،1 . تمّ الاعتماد على بروتوكول الشركة الصانعة لطاقم qPCR Master Mix

program	Initial[1] denaturation	Amplification		
cycles	1	40 cycles		
Target Temperature C°	95	Denaturation[1]	annealing	Extension[1]
		95	50	72
			54	
			55	
			56	
			60	
Time[1]	3min	3 S	20 S	10 S

2-3-5-2. ثانياً: تحرّي التركيز الأمثل للمشارع

تم اختبار 10 تراكيز مختلفة للبادئات (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1µM).

جدول(2-13) تراكيز متعددة للمشارع التي تمّ اختبارها، PC1: Positive control ، 2Negative template control NTC

Component	Final Conc	PC[1] Vol.(µl)	NTC[2] Vol.(µl)
H_2O	–	To 20µl	To 20µl
Primer(9µM)	0.1µM	0.2 µl	0.2 µl
	0.2µM	0.44 µl	0.44 µl
	0.3µM	0.6µl	0.6µl
	0.4µM	0.88µl	0.88µl
	0.5µM	1µl	1µl
	0.6µM	1.33µl	1.33µl
	0.7µM	1.5µl	1.5µl
	0.8µM	1.78µl	1.78µl
	0.9µM	2µl	2µl
	1µM	2.22µl	2.22µl
Reaction Mix	1×	10µl	10µl
DNA Template	–	1	–
Total (µl)	–	20	20

2-3-5-3. ثالثاً: تحرّي التركيز الأمثل للمسابير

تم اختبار 5 تراكيز مختلفة للبادئات (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5µM).

جدول(2-14) تراكيز متعددة للمسابير التي تمَّ اختبارها

Component	Final Conc	PC[1] Vol.(µl)	NTC[2] Vol.(µl)
H_2O	-	To 20 µl	To 20 µl
Probe(2.5µM)	0.1µM	0.8 µl	0.8 µl
	0.2µM	1.6 µl	1.6 µl
	0.3µM	2.4 µl	2.4 µl
	0.4µM	3.2 µl	3.2 µl
	0.5µM	4 µl	4 µl
Reaction Mix	1×	10µl	10µl
DNA Template	-	1	-
Total (µl)	-	20	20

2-3-5-4. رابعاً: تحرّي الحجم الأمثل لـ DNA template

تمَّ اختبار 5 أحجام مختلفة من DNA template (1, 2, 3, 4, 5) ميكرون لعينة الدم ثم تمّت إعادة إختبار حجوم DNA template بعينة لعاب بعد اعتماد المعالمparameter السابقة (درجة حرارة التلدينannealing temperature وتركيز المبدئات primer concentration وتركيز المسابر prop concentration).

2-3-5-5. تمَّ الاعتماد على الشروط المثلى لكافة المعالم التي تمّ اختبارها كما هو موضح بالجدول التالي:

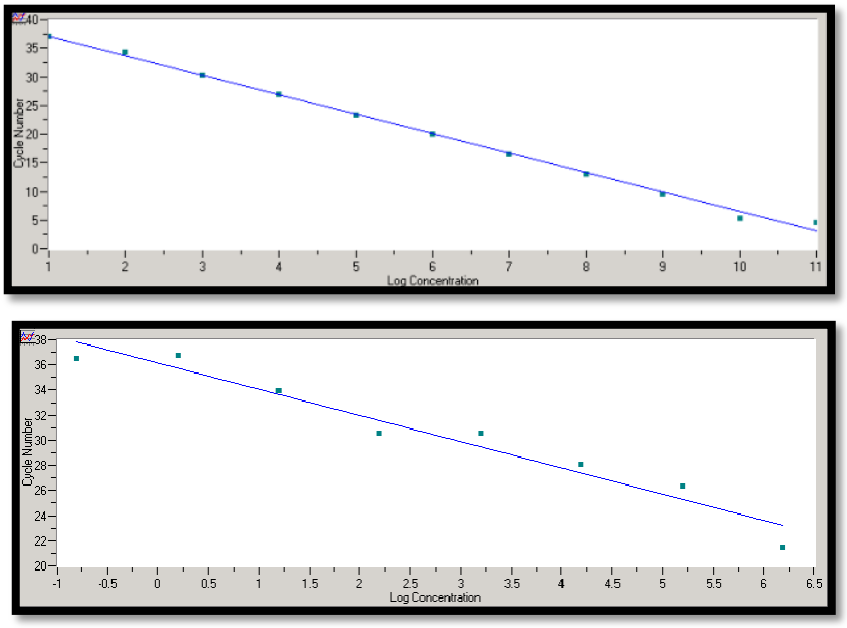
جدول(2-15) اعتماد الشروط المثلى لكافة المعالم

	DNA Template	Primer(100µM) (Forward- Reverse)		Prop (50µM)		Annealing Temperature (C°)	cycles
		Conc(µM)	Vol(µl)	Conc(µM)	Vol(µl)		
Mt	3 µl	0.4	4	0.4	8	60	40
N	3µl	1	10	0.4	8	55	50

2-3-5-6. اختبار العياري:

تمّ اختبار العياري بعد تثبيت المعالم السابقة وكانت نتيجة Efficiency لعياري الدنا المتقدري 90.71% بينما كانت Efficiency لعياري الدنا النووي 91.28%.

A الدنا النووي

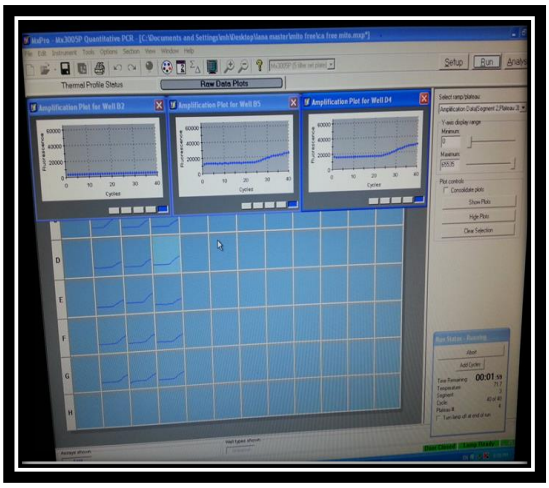


B الدنا المتقدري

شكل(2-14)Aعياري الدنا النووي، B عياري الدنا المتقدري

2-4.اختبار العينات:

تمَّ قياس العينات بإعتماد البروتوكول السابق للعاب وبإستخدام المنحنيات العيارية لعينة الدم لكلاً من الدنا النووي والدنا المتقدري.



شكل(2-15) واجهة لجهاز Real-Time PCR توضح اختبارالعينات وNTC non templete control

2-5. التحليل الإحصائي:

تم حساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري الموافقة للمتغيرات الكمية مثل حساب أعمار المرضى، ومدة التدخين، وعدد السجائر المتناولة، ومدة الإصابة بالآفة الفموية، ومرحلة الإصابة بالآفه الفموية وفقاً للمجموعة المدروسة، بينما تمَّ حساب التكرارت والنسب المئوية للمتغيرات النوعية، كتوزع عينة البحث، وجنس المريض، وعادة تناول الكحوليات، وعادة التدخين، وتوضع الآفة، والتصنيف النسيجي للطلاوة. تم إجراء اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي بين مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة ومجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة ومجموعة الأشخاص الأصحّاء في عينة البحث، ولدراسة العلاقة بين قيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي والإصابة بالآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة ، كما تمَّ إجراء اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي

بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث في عينة البحث و بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين في عينة البحث، وبين مجموعة المصابين بسوء تصنّع ومجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة، وتم حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريض (بالسنوات)، و العلاقة بين عدد السجائر المتناولة يومياً، والعلاقة بين قيم مدة التدخين (بالسنوات)، وقيم مدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي Total mtDNA ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي Total nDNA ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة، تمَّ حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين مرحلة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة، ودرجة الإصابة بالآفة الفموية محتملة الخباثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي Total mtDNA ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي Total nDNA ونسبة لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث.

الباب الثالث

3-1. أولاً – وصف عينة البحث:

تألفت عينة البحث من 58 مريضاً ومريضةً تراوحت أعمارهم بين 24 و82 عاماً وكانوا مقسمين إلى ثلاث مجموعات رئيسة وفقاً لحالة المريض (مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة، مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة، مجموعة الأشخاص الأصحّاء (المجموعة الشاهدة))، وقد كان توزع عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة والجنس والعمر كما يلي:

توزع عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة والجنس والعمر كما يلي:

3-1-1: توزع عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول (3-1) توزع عينة البحث وفقاً للمجموعة المدرسة

المجموعة المدروسة	عدد المرضى	النسبة المئوية
مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	29.3
مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	21	36.2
مجموعة الأشخاص الأصحّاء	20	34.5
المجموع	58	100

3-1-2. توزع عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة:

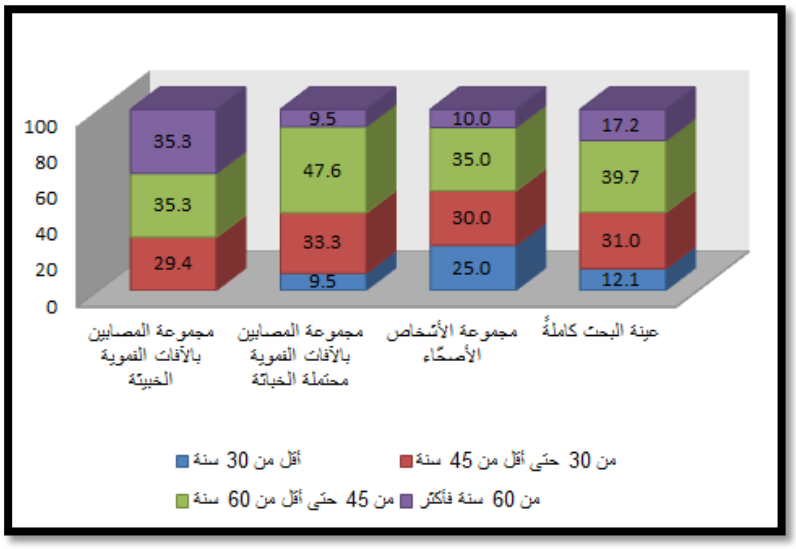
جدول رقم (3-2) توزع عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة

المجموعة المدروسة	عدد المرضى			النسبة المئوية		
	ذكر	أنثى	المجموع	ذكر	أنثى	المجموع
مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	11	6	17	64.7	35.3	100
مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	16	5	21	76.2	23.8	100
مجموعة الأشخاص الأصحّاء	13	7	20	65.0	35.0	100
عينة البحث كاملةً	40	18	58	69.0	31.0	100

3-1-3. المتوسط الحسابي لأعمار المرضى في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-3) الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لأعمار المرضى (بالسنوات) في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	عدد المرضى	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
عمر المريض (بالسنوات)	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	30	82	52.8	16.9
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	21	25	69	46.1	9.9
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	20	24	77	42.4	14.3
	عينة البحث كاملةً	58	24	82	46.8	14.2



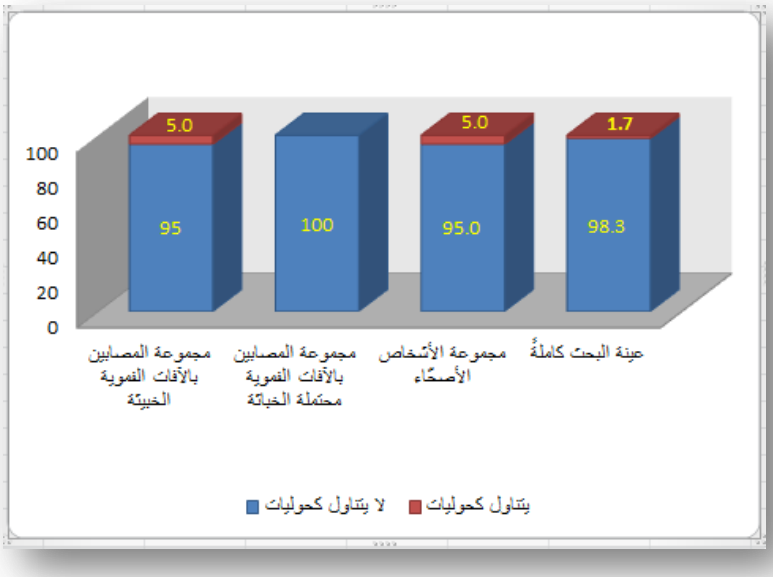
مخطط رقم (3-1) يمثل النسبة المئوية لتوزع عينة البحث وفقاً للفئة العمرية للمريض والمجموعة المدروسة.

3-2. الدراسة الإحصائية التحليلية:

تم الاستقصاء عن بعض خصائص المرضى من حيث (عادة تناول الكحول، عادة التدخين، مدة التدخين) لكل مريض ومريضة في عينة البحث، كما تم الاستقصاء عن توضّع الآفة في الفم ومدة الإصابة بالآفة، وقد تم إجراء فحص نسيجي وتم تحديد كل من نوع الآفة محتملة الخباثة ودرجة الإصابة النسيجية بالآفة محتملة الخباثة لكل مريض ومريضة في كل من مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة ومجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة، ثم تمَّ قياس وحساب كل من مستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ومستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة مستوى الدنا المتقدري الكلي / مستوى الدنا النووي الكلي لكل مريض ومريضة في عينة البحث ثم تمَّت دراسة تأثير المجموعة المدروسة في كل من المتغيرات المقيسة والمحسوبة، وتمت دراسة العلاقة بين جنس المريض وعمر المريض والفئة العمرية للمريض وعادة التدخين ومدة التدخين ومدة الإصابة بالآفة ودرجة الإصابة بالآفة وقيم المتغيرات المقيسة والمحسوبة وفقاً للمجموعة المدروسة في عينة البحث وكانت نتائج التحليل كما يلي:

3-2-1. نتائج الاستقصاء عن بعض خصائص المرضى في عينة البحث:

- **نتائج الاستقصاء عن عادة تناول الكحوليات في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:**



مخطط رقم (3-2) يمثل نتائج الاستقصاء عن عادة تناول الكحوليات في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة

➢ نتائج الاستقصاء عن عادة التدخين في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-4) نتائج الاستقصاء عن عادة التدخين في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة

المجموعة المدروسة	عدد المرضى			النسبة المئوية		
	غير مدخّن	مدخّن	المجموع	غير مدخّن	مدخّن	المجموع
مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	5	12	17	29.4	70.6	100
مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	6	15	21	28.6	71.4	100
مجموعة الأشخاص الأصحّاء	8	12	20	40.0	60.0	100
عينة البحث كاملةً	19	39	58	32.8	67.2	100

➢ المتوسط الحسابي لمدة التدخين في مجموعة المدخّنين من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-5) الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لمدة التدخين (بالسنوات) في مجموعة المدخّنين من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة = مجموعة المدخّنين من عينة البحث					
	المجموعة المدروسة	عدد المرضى	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
مدة التدخين (بالسنوات)	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	12	7	45	26.0	12.1
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	15	8	35	20.4	8.7
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	12	10	40	20.8	8.5
	مجموعة المدخّنين كاملةً	39	7	45	22.3	9.9

➢ المتوسط الحسابي لعدد السجائر المتناولة يومياً في مجموعة المدخّنين من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-6) الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لعدد السجائر المتناولة يومياً في مجموعة المدخّنين من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة = مجموعة المدخّنين من عينة البحث					
	المجموعة المدروسة	عدد المرضى	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
عدد السجائر المتناولة يومياً	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	11	20	60	31.8	15.4
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	15	15	60	30.3	14.9
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	12	30	60	37.5	8.7
	مجموعة المدخّنين كاملةً	38	15	60	33.0	13.4

➢ المتوسط الحسابي لمدة الإصابة بالآفة الفموية في مجموعة المرضى من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-7) يبين الحد الأدنى والحد الأعلى والمتوسط الحسابي والانحراف المعياري لمدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر) في مجموعة المرضى من عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

المجموعة المدروسة = مجموعة المرضى من عينة البحث						
المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	عدد المرضى	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
مدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر)	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	1	24	4.6	5.7
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	15	2	240	46.1	79.5
	مجموعة المرضى كاملةً	32	1	240	24.1	57.6

➢ نتائج الاستقصاء عن توضّع الآفة في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة:

جدول رقم (3-8) يبين نتائج الاستقصاء عن توضّع الآفة في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

توضّع الآفة	عدد المرضى			النسبة المئوية		
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	مرضى عينة البحث كاملةً	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	مرضى عينة البحث كاملةً
قاع الفم	1	1	2	5.9	4.8	5.3
الفك العلوي	4	0	4	23.5	0	10.5
الفك السفلي	5	0	5	29.4	0	13.2
الفك العلوي وقاع الفم	4	0	4	23.5	0	10.5
حافّة اللسان	2	2	4	11.8	9.5	10.5
المخاطية الفموية	1	8	9	5.9	38.1	23.7
زاوية الفم	0	8	8	0	38.1	21.1
سنخ الفك	0	1	1	0	4.8	2.6
المثلث خلف الرحوي	0	1	1	0	4.8	2.6
المجموع	17	21	38	100	100	100

➢ نتائج الاستقصاء عن مرحلة الإصابة بالآفة الفموية في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث:

جدول رقم (3-9) نتائج الاستقصاء عن درجة الإصابة بالآفة الفموية في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث.

المجموعة المدروسة	مرحلة الإصابة بالآفة الفموية	عدد المرضى	النسبة المئوية
مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	مرحلة 0	3	17.6
	مرحلة II	1	5.9
	مرحلة III	4	23.5
	مرحلة IV A	4	23.5
	مرحلة IV B	1	5.9
	مرحلة IV C	4	23.5
	المجموع	17	100

➢ نتائج الاستقصاء عن التصنيف النسيجي للطلاوة في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث:

جدول رقم (3-10) نتائج الاستقصاء عن درجة التصنيف النسيجي للطلاوة في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث.

المجموعة المدروسة	التصنيف النسيجي	عدد المرضى	النسبة المئوية
مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	سوء تصنّع	11	52.4
	فرط تصنّع	10	47.6
	المجموع	21	100

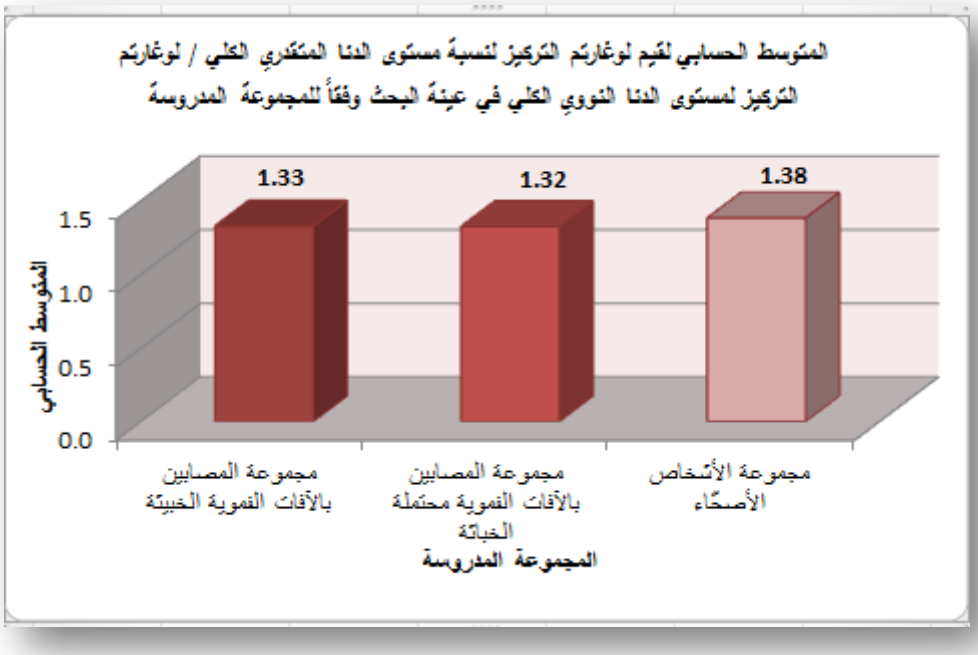
3-3. دراسة المتغيرات المتعلقة بالدنا في اللعاب في عينة البحث:

➢ دراسة تأثير المجموعة المدروسة في قيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي في عينة البحث:

- **إحصاءات وصفية:**

جدول رقم (3-11) المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لقيم كل من لوغاريم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	عدد المرضى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	8.44	0.58	7.59	9.61
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	21	8.30	1.34	6.27	11.40
	الأشخاص الأصحّاء	20	8.20	0.61	6.48	8.93
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	6.47	1.04	5.53	9.19
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	21	6.25	0.43	5.74	7.17
	الأشخاص الأصحّاء	20	5.94	0.31	5.53	6.71
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	17	1.33	0.19	0.89	1.67
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	21	1.32	0.17	1.03	1.82
	الأشخاص الأصحّاء	20	1.38	0.11	1.16	1.60



مخطط رقم (3-3) يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً للمجموعة المدروسة.

- **نتائج اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA:**

جدول رقم (3-12) نتائج اختبار تحليل التباين أحادي الجانب ANOVA لدراسة دلالة الفروق في متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغاريم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي بين مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة ومجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة ومجموعة الأشخاص الأصحّاء في عينة البحث.

المتغير المدروس	قيمة F المحسوبة	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	0.288	0.751	لا توجد فروق دالّة
الوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	3.205	0.048	**توجد فروق دالّة**
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	0.835	0.439	لا توجد فروق دالّة

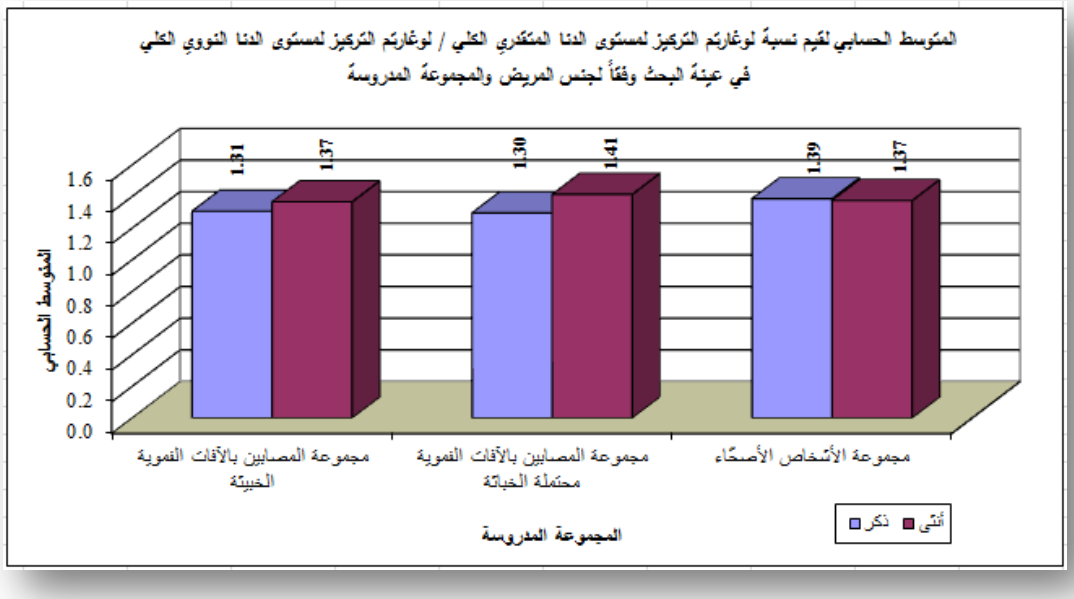
يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 بالنسبة لكل من لوغاريتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط لوغاريم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي بين المجموعات الثلاث المدروسة (مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة، مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة، مجموعة الأشخاص الأصحّاء) في عينة البحث.

دراسة تأثير جنس المريض في قيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- إحصاءات وصفية:

جدول رقم (3-13) المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	جنس المريض	عدد المرضى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	ذكر	11	8.49	0.57	7.59	9.61
		أنثى	6	8.33	0.64	7.80	9.22
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	ذكر	16	8.09	1.18	6.27	10.31
		أنثى	5	8.95	1.73	7.57	11.40
	الأشخاص الأصحّاء	ذكر	13	8.25	0.50	7.35	8.93
		أنثى	7	8.11	0.81	6.48	8.85
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	ذكر	11	6.67	1.20	5.68	9.19
		أنثى	6	6.12	0.59	5.53	7.20
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	ذكر	16	6.22	0.44	5.74	7.17
		أنثى	5	6.35	0.43	5.82	6.90
	الأشخاص الأصحّاء	ذكر	13	5.97	0.34	5.53	6.71
		أنثى	7	5.90	0.25	5.57	6.23
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	ذكر	11	1.31	0.23	0.89	1.67
		أنثى	6	1.37	0.11	1.28	1.56
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	ذكر	16	1.30	0.12	1.03	1.49
		أنثى	5	1.41	0.27	1.11	1.82
	الأشخاص الأصحّاء	ذكر	13	1.39	0.11	1.18	1.60
		أنثى	7	1.37	0.11	1.16	1.50



- **مخطط رقم (3-4) يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لجنس المريض والمجموعة المدروسة.**

- **نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة:**

جدول رقم (3-14) نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	قيمة Tالمحسوبة	درجات الحرية	الفرق بين المتوسطين	الخطأ المعياري للفرق	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.543	15	0.16	0.30	0.595	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	-1.269	19	-0.86	0.67	0.220	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.495	18	0.14	0.29	0.627	لا توجد فروق دالّة
اللوغاتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	1.039	15	0.55	0.53	0.315	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	-0.562	19	-0.13	0.22	0.581	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.506	18	0.07	0.15	0.619	لا توجد فروق دالّة
نسبة اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي / اللوغارتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	-0.601	15	-0.06	0.10	0.557	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	-1.375	19	-0.12	0.08	0.185	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.232	18	0.01	0.05	0.819	لا توجد فروق دالّة

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير المدروس ومهما كانت المجموعة المدروسة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط كل من اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA

Total واللوغارتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي / اللوغارتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي بين مجموعة الذكور ومجموعة الإناث في عينة البحث، ولا تأثير لجنس المريض على قيم كل من اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total واللوغارتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة اللوغارتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي / اللوغارتم العشري لمستوى الدنا النووي الكلي مهما كانت المجموعة المدروسة في عينة البحث.

➢ دراسة العلاقة بين قيم عمر المريض وقيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون:

جدول رقم (3-15) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم عمر المريض (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير الثاني	المجموعة المدروسة	المتغير الأول = عمر المريض			دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة			
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	-0.042	17	0.872	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.458	21	0.037	**توجد علاقة دالة**	طردية	متوسطة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	-0.445	20	0.049	**توجد علاقة دالة**	عكسية	متوسطة
	عينة البحث كاملةً	0.084	58	0.531	لا توجد علاقة دالة	-	-
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.034	17	0.897	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.224	21	0.328	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.034	20	0.887	لا توجد علاقة دالة	-	-
	عينة البحث كاملةً	0.151	58	0.259	لا توجد علاقة دالة	-	-
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.002	17	0.993	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.446	21	0.043	**توجد علاقة دالة**	طردية	متوسطة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	-0.461	20	0.725	لاتوجد علاقة دالة	-	-
	عينة البحث كاملةً	-0.026	58	0.846	لا توجد علاقة دالة	-	-

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05 بالنسبة لكل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم عمر المريض (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري

الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في كل من مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية لمعاملي الارتباط الموافقين لمجموعة الأشخاص المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة كانت موجبة نستنتج أن كلاً من العلاقتين الموافقتين كانت طردية (ارتفاع قيم عمر المريض يوافقه ارتفاع في قيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي)، وبما أن القيم المطلقة لمعامل الارتباط الموافقة كانت قريبة من القيمة 0.05 نستنتج أن العلاقة الموافقة كانت متوسطة الشدة في عينة البحث.

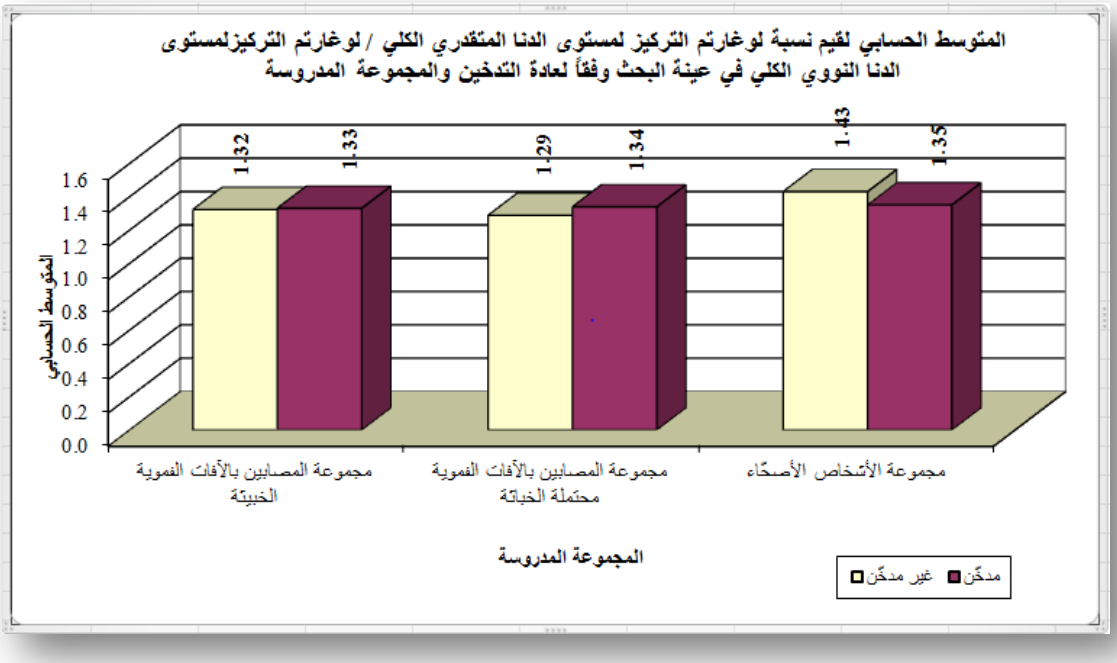
أما بالنسبة لباقي معاملات الارتباط المحسوبة فيُلاحظ أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم عمر المريض (بالسنوات) وقيم لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total مهما كانت المجموعة المدروسة في عينة البحث، وكذلك لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم عمر المريض (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي /لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة وفي عينة البحث كاملةً ومجموعة الأصحاء.

➢ دراسة تأثير عادة التدخين في قيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- إحصاءات وصفية:

جدول رقم (3-16) المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لعادة التدخين والمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	عادة التدخين	عدد المرضى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	غير مدخّن	5	8.51	0.59	7.82	9.06
		مدخّن	12	8.41	0.60	7.59	9.61
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	غير مدخّن	6	8.15	0.99	7.28	10.02
		مدخّن	15	8.36	1.48	6.27	11.40
	الأشخاص الأصحّاء	غير مدخّن	8	8.61	0.23	8.23	8.93
		مدخّن	12	7.93	0.64	6.48	8.86
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	غير مدخّن	5	6.60	1.45	5.80	9.19
		مدخّن	12	6.42	0.89	5.53	8.82
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	غير مدخّن	6	6.33	0.49	5.81	6.90
		مدخّن	15	6.22	0.41	5.74	7.17
	الأشخاص الأصحّاء	غير مدخّن	8	6.04	0.37	5.58	6.71
		مدخّن	12	5.88	0.26	5.53	6.26
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	غير مدخّن	5	1.32	0.21	0.98	1.56
		مدخّن	12	1.33	0.19	0.89	1.67
	المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	غير مدخّن	6	1.29	0.12	1.11	1.46
		مدخّن	15	1.34	0.19	1.03	1.82
	الأشخاص الأصحّاء	غير مدخّن	8	1.43	0.09	1.33	1.53
		مدخّن	12	1.35	0.11	1.16	1.60



مخطط رقم (3-5) يمثل المتوسط الحسابي لقيم نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في عينة البحث وفقاً لعادة التدخين والمجموعة المدروسة

- نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة:

جدول رقم (3-17) نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين في عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير المدروس	المجموعة المدروسة	قيمة Tالمحسوبة	درجات الحرية	الفرق بين المتوسطين	الخطأ المعياري للفرق	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.318	15	0.10	0.32	0.755	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	-0.319	19	-0.21	0.66	0.753	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	2.837	18	0.68	0.24	0.011	توجد فروق دالّة
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.321	15	0.18	0.57	0.752	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.527	19	0.11	0.21	0.604	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	1.118	18	0.16	0.14	0.278	لا توجد فروق دالّة
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	-0.071	15	-0.01	0.10	0.944	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	-0.622	19	-0.05	0.08	0.541	لا توجد فروق دالّة
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	1.686	18	0.08	0.05	0.109	لا توجد فروق دالّة

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05 بالنسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total في مجموعة الأشخاص الأصحّاء، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين في عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية للفرق بين المتوسطين موجبة نستنتج أن قيم لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total في مجموعة الأشخاص الأصحّاء غير المدخّنين كانت أكبر منها في مجموعة الأشخاص الأصحّاء المدخّنين في عينة البحث.

أما بالنسبة لباقي المجموعات الفرعية المدروسة فيُلاحظ أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين مهما كانت المجموعة المدروسة في عينة البحث، وكذلك لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط اللوغاريتم العشري لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة غير المدخّنين ومجموعة المدخّنين في كل من مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة ومجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة على حدة في عينة البحث.

➢ دراسة العلاقة بين عدد السجائر المتناولة يومياً وقيم المتغيرات المتعلقة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون:

جدول رقم (3-18) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين عدد السجائر المتناولة يومياً وقيم كل و لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير الثاني	المجموعة المدروسة	المتغير الأول = عدد السجائر المتناولة يومياً					
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة	دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	-0.456	11	0.158	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.205	15	0.464	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.222	12	0.488	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.018	38	0.916	لا توجد علاقة دالة	-	-
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.199	11	0.557	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.002	15	0.994	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	-0.162	12	0.616	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.012	38	0.942	لا توجد علاقة دالة	-	-
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	-0.397	11	0.226	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.262	15	0.346	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.294	12	0.354	لا توجد علاقة دالة	-	-
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.024	38	0.886	لا توجد علاقة دالة	-	-

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس ومهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المدخّنين كاملةً، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين عدد السجائر المتناولة يومياً وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك مهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المدخّنين كاملةً.

➢ دراسة العلاقة بين قيم مدة التدخين وقيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون:

جدول رقم (3-19) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مدة التدخين (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير الثاني	المجموعة المدروسة	المتغير الأول = مدة التدخين					
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة	دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	−0.545	12	0.067	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.324	15	0.238	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.191	12	0.551	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.092	39	0.578	لا توجد علاقة دالة	–	–
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.101	12	0.754	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	−0.029	15	0.919	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	−0.111	12	0.731	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.101	39	0.543	لا توجد علاقة دالة	–	–
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	−0.329	12	0.296	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	0.431	15	0.109	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة الأشخاص الأصحّاء	0.229	12	0.474	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المدخّنين كاملةً	0.055	39	0.741	لا توجد علاقة دالة	–	–

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس ومهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المدخّنين كاملةً، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم مدة التدخين (بالسنوات) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز للـ nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المدخّنين من عينة البحث، وذلك مهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المدخّنين كاملةً.

➢ دراسة العلاقة بين قيم مدة الإصابة بالآفة الفموية وقيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للمجموعة المدروسة:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون:

جدول رقم (3-20) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط بيرسون لدراسة طبيعة العلاقة بين قيم مدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المرضى من عينة البحث، وذلك وفقاً للمجموعة المدروسة.

المتغير الثاني	المجموعة المدروسة	المتغير الأول = مدة الإصابة بالآفة الفموية			دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة			
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.023	17	0.929	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	−0.152	15	0.588	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المرضى كاملةً	−0.077	32	0.677	لا توجد علاقة دالة	–	–
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	−0.165	17	0.527	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	−0.024	15	0.932	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المرضى كاملةً	−0.041	32	0.822	لا توجد علاقة دالة	–	–
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	0.158	17	0.545	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة	−0.149	15	0.597	لا توجد علاقة دالة	–	–
	مجموعة المرضى كاملةً	−0.043	32	0.817	لا توجد علاقة دالة	–	–

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس ومهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المرضى كاملةً، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين قيم مدة الإصابة بالآفة الفموية (بالأشهر) وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المرضى من عينة البحث، وذلك مهما كانت المجموعة المدروسة وفي مجموعة المرضى كاملةً.

➢ دراسة العلاقة بين درجة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة وقيم المتغيرات المتعلقة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان:

جدول رقم (3-21) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين درجة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث.

المجموعة المدروسة	المتغير الثاني	المتغير الأول = درجة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة			دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة			
مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة	لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mt DNA	0.226	17	0.383	لا توجد علاقة دالة	-	-
	لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	-0.248	17	0.337	لا توجد علاقة دالة	-	-
	نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	0.208	17	0.424	لا توجد علاقة دالة	-	-

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين درجة الإصابة بالآفة الفموية الخبيثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية الخبيثة من عينة البحث.

➢ دراسة تأثير التصنيف النسيجي في قيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي:

- إحصاءات وصفية:

جدول رقم (3-22) المتوسط الحسابي والانحراف المعياري والخطأ المعياري والحد الأدنى والحد الأعلى لكل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث وفقاً لنوع الطلاوة.

المجموعة المدروسة = مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة						
المتغير المدروس	التصنيف النسيجي للطلاوة	عدد المرضى	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	الحد الأدنى	الحد الأعلى
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكليmt DNA	سوء تصنّع	11	8.72	1.14	6.95	10.31
	فرط تصنّع	10	7.84	1.43	6.27	11.40
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي n DNA	سوء تصنّع	11	6.46	0.40	5.77	7.17
	فرط تصنّع	10	6.03	0.35	5.74	6.90
نسبة لوغرتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	سوء تصنّع	11	1.34	0.11	1.16	1.52
	فرط تصنّع	10	1.30	0.22	1.03	1.82

- **نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة:**

جدول رقم (3-23) نتائج اختبار T ستيودنت للعينات المستقلة لدراسة دلالة الفروق في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total بين مجموعة المصابين بسوء تصنّع ومجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث.

المجموعة المدروسة = مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة						
المتغير المدروس	قيمة Tالمحسوبة	درجات الحرية	الفرق بين المتوسطين	الخطأ المعياري للفرق	قيمة مستوى الدلالة	دلالة الفروق
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	1.570	19	0.88	0.56	0.133	لا توجد فروق دالّة
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	2.668	19	0.44	0.16	0.015	**توجد فروق دالّة**
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	0.586	19	0.04	0.08	0.564	لا توجد فروق دالّة

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أصغر من القيمة 0.05 بالنسبة للوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total، أي أنه عند مستوى الثقة 95% توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total بين مجموعة المصابين بسوء تصنّع ومجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث، وبما أن الإشارة الجبرية للفرق بين المتوسطين موجبة نستنتج أن قيم لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total في مجموعة المصابين بسوء تصنّع كانت أكبر منها في مجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث.

أما بالنسبة لكل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي فيُلاحظ أن قيمة مستوى الدلالة أكبر بكثير من القيمة 0.05، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد فروق ذات دلالة إحصائية في متوسط كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي بين مجموعة المصابين بسوء تصنّع ومجموعة المصابين بفرط تصنّع في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث.

➢ دراسة العلاقة بين درجة الإصابة النسيجية بالآفة الفموية محتملة الخباثة وقيم المتغيرات المتعلقة بلوغارتم التركيز لمستوى الدنا الكلي وفقاً للتصنيف النسيجي للطلاوة:

- نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان:

جدول رقم (3-24) نتائج حساب قيم معاملات الارتباط سبيرمان لدراسة طبيعة العلاقة بين درجة الإصابة النسيجية بالآفة الفموية محتملة الخباثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث، وذلك وفقاً للتصنيف النسيجي للطلاوة.

المتغير الثاني	نوع الطلاوة	المتغير الأول = درجة التصنيف النسيجي بالآفة الفموية محتملة الخباثة			دلالة وجود العلاقة	جهة العلاقة	شدة العلاقة
		قيمة معامل الارتباط	عدد المرضى	قيمة مستوى الدلالة			
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total	سوء تصنّع	0.029	11	0.932	لا توجد علاقة دالة	–	–
	فرط تصنّع	−0.071	10	0.846	لا توجد علاقة دالة	–	–
لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total	سوء تصنّع	0.177	11	0.604	لا توجد علاقة دالة	–	–
	فرط تصنّع	−0.551	10	0.099	لا توجد علاقة دالة	–	–
نسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي	سوء تصنّع	0.044	11	0.897	لا توجد علاقة دالة	–	–
	فرط تصنّع	0.173	10	0.632	لا توجد علاقة دالة	–	–

يبين الجدول أعلاه أن قيمة مستوى الدلالة أكبر من القيمة 0.05 مهما كان المتغير الثاني المدروس ومهما كان التصنيف النسيجي للطلاوة، أي أنه عند مستوى الثقة 95% لا توجد علاقة ارتباط خطية ذات دلالة إحصائية بين درجة التصنيف النسيجي بالآفة الفموية محتملة الخباثة وقيم كل من لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي mtDNA Total ولوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي nDNA Total ونسبة لوغارتم التركيز لمستوى الدنا المتقدري الكلي / لوغارتم التركيز لمستوى الدنا النووي الكلي في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث، وذلك مهما كان نوع الطلاوة في مجموعة المصابين بالآفات الفموية محتملة الخباثة من عينة البحث.

الباب الرابع

4-1.المناقشة:

ما يزال سرطان الرأس والعنق أحد أهم المشكلات في الصحة العامّة عالمياً ومحلياً، ومعاناةً صحيةً تنوء بالمريض وذويه سنواتٍ عديدة، وعبئاً مادياً يتكبّده المجتمع في تكاليف تشخيصها ومعالجتها ورصدها. ويزداد القلق حيالها حين لا يشكو المرضى أعراضاً وصفيّةً موجِّهة، فيكشف غالباً المرض في مراحله المبكرة بمحض الصدفة وذلك عن طريق الكشف العياني عند طبيب الأسنان لأغراض أخرى سنيةٍ أو لثويةٍ، إذ يعاني غالبية المرضى من اكتشاف المرض في مراحل متقدمة، وبالتالي يواجه المريض عقابيل المرض دون تدبير علاجيٍّ في الوقت المناسب، لهذا لابد من توعية المجتمع لضرورة الكشف الدوري عند طبيب الأسنان وخصوصاً المرضى ذوي الخطورة العالية وإنشاء مراكز خاصة تقوم بالكشف والتوعية على السواء مما ينتج عنه نجاح برنامج مكافحة السرطان والحد من العوامل الإمراضية، كما تقدم بيانات موثوقة لمعرفة نزعة الأورام خلال فترة زمنية محددة، وعليه يمكن تقييم برامج مكافحة الأورام ومدى نجاحها وتصحيحها أو تعديلها، وكذلك تساعد على توجيه وحسن استغلال مجموعة من الكوادر الصحية المتوفرة وذوي الخبرة ويبنى على البيانات التي توفرها هذه المراكز برامج مكافحة للسرطان وفق الأولويات (Mishra 2012)، التي تعكسها من عوامل خطورة الإصابة بسرطان الرأس والعنق كالتدخين، وتناول الكحول، لأنهما يتسببان بشكل رئيسي بالإصابة بسرطان شائك الخلايا في الحفرة الفموية بينما يعد فيروس الورم الحليمي البشري(HPV) مسبباً رئيسياً للسرطان الفموي البلعومي(Messadi 2013)، ثم إن تناول بعض الأدوية الجهازية، وبعض الأمراض الجهازية التي تعرف بحالة طبية عامة ترتبط بزيادة نسبة الخطورة للتحول السرطاني في أي جهة من الفم دون ظهور آفه فموية مسبقة (S.PORTER 2002) وتشمل التهاب الشفة السفعي actinic cheilitis (Villa et al. 2011) Jerry E. Bouquot & Nadarajah Vigneswaran) 2010)، وعسر البلع الناجم عن قلة الحديد sideropenic dysphagia، والحزاز المنبسط، والتليف تحت المخاطيةoral sub mucous fibrosis، والزهري، والذئبة الحمامية القرصية Discoid lupus erythromatous(Napier & Speight 2008)، وجفاف الجلد المصطبغ xeroderma pimmentosum، وتترافق هذه الأمراض بأحد عوامل الخطورة على السواء والتي من شأنها إحداث تخريش في الأنسجة الفموية مما يجعلها أكثر عرضة للإصابة بالآفات الفموية محتملة الخباثة (Panwar SK1 2013) وقد يتسبب ذلك بتراكم العديد من التغيرات المورثية مما يؤدي إلى إحداث آفات سريريه محتملة الخباثة تشتمل على تغيرات نسيجية تتراوح بين فرط تصنع وسوء تصنع خفيف و سوء تصنع نسيجي وخيم و سرطان موضع إلى أن ينتهي بسرطان باضع (Viviana P. Lutzky & Boyle 2008). وتعتبر هذه البيانات

مصدراً غنياً وغير متحيزً للباحثين في مجال تحديد عوامل الخطر وعوامل الوقاية وتحليلها(Parkin et al. 1999).

ويعتبر سرطان الفم ثامن الأسباب الشائعة لإحداث الوفيات وذلك على الرغم من أن العديد من الناس غير مدركين له (Jung-Il Chae 2014) (Ranjith Raveendran 2012) (Johnson et al. 2011) وحسب تصنيف منظمة الصحة العالمية يحتل سرطان الفم المرتبة السادسة بين الذكور في الدول المتقدمة حيث إنه يلي سرطان الرئة والبروستات والقولون والمعدة والمثانة بينما يحتل المرتبة العاشرة عند الإناث إذ إنه يلي سرطان الثدي، والقولون، والمستقيم والرئة، والمعدة، والرحم، وعنق الرحم، والمبيض، والمثانة والكبد (Abhimanyu Mohanta 2013) (Mehrotra & Yadav 2006) ويقدر معدل الإصابة بسرطان الفم على المستوى العالمي بـ500000 حالة مشخصة حديثاً في العام الواحد وقد وجد أنه يشكل 3% من إجمالي الحالات الخبيثة ولهذا يعتبر من المشاكل عالمية الانتشار. يصيب الأفراد بعمر يتراوح بين 40-60 عاماً كما انه يصيب الذكور بشكل مضاعف مقارنة بالإناث (Messadi 2013) ويعتبر السرطان البشروي شائك الخلايا أكثر أنماط سرطان الفم النسيجية شيوعاً (Johnson et al. 2011) .

4-1-1. قصور/ محدودية الدراسة: Study limitations / Weakness

يؤخذ على هذه الدراسة عدة مآخذ من أهمها أنها لا تمثل المجتمع السوري بأكمله، فلا يمكن الجزم بأنَّ عدد العينات المأخوذة يغطي كافة المجتمع السوري. ومما يؤخذ على هذه الدراسة أيضاً انخفاض جودة بيانات المرضى والفحوصات التي لابد من القيام بها لمريض السرطان للتقصي عن وجود بعض الأمراض الجهازية، وبالتالي اعتمد الباحث على اضبارة المرضى فقط لتقصي هذه الأمراض، إذ يعتبر وجود بعض الفحوصات الدقيقة جزءاً مهماً لنجاح برامج مكافحة السرطان وتعود فوائده على الفرد والمجتمع، وبالتالي يؤدي إلى الحد من معدلات الحدوث والوفيات وتحسين معدلات البقيا، يُؤخذ على هذه الدراسة أنها لم تشمل عدداً كافياً من حالات السرطان والآفات محتملة الخباثة بكافة المراحل والدرجات النسيجية، ويُعزى ذلك إلى الاعتماد على المرضى المراجعين لكلية طب الأسنان، وبدرجةٍ أكبر الاعتماد على المرضى المراجعين لقسم طب الفم والجراحة وخاصةً مرضى الآفات الفموية محتملة الخباثة ومعظم هؤلاء المرضى لا يراجعون إلا عند ظهور أعراضٍ أو علاماتٍ تدفعهم للبحث عن المعالجة، فالآفات الفموية محتملة الخباثة لا تتظاهر بأي أعراض كما أن الآفات الفموية الخبيثة لا تتظاهر بأعراض في مراحلها المبكرة، وقد تمَّ بذل جهد من قبِل الباحث وذلك من خلال النزول إلى بعض المناطق ذوي الدخل المحدود للتقصي عن الآفات وجمع عدد عينات أكبر ولكنة قُوبِلَ بعدم تعاون العديد

من العامة، أما بالنسبة للآفات الفموية الخبيثة فقد تمَّ جمع العينات من مستشفى المجتهد والمواساة، وهنا تجدر الإشارة إلى حصول الباحث على طلب رسمي- في كل من مستشفى المواساة ومستشفى المجتهد ومشفى الأسد الجامعي، إلَّا أنَّ عدد المرضى المصابين بسرطان شائك الخلايا كان قليلاً جداً، بالإضافة إلى أن مرحلة الورم كانت متقدمة، كما أنه لا توجد حالات آفات فموية محتملة الخباثة تراجع المستشفى، مما يجدر ذكره أن غالبية إصابات المرضى الذين يراجعون وحدة الرأس والعنق في مشفى المجتهد والمواساه هي سرطانات البلعوم والحنجرة، وعدد قليل من سرطان شائك الخلايا في الحفرة الفموية، بناءً على ماسبق ذكره يتبين أنَّ أنسب وسيلةٍ للحصول على مرضى الآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة هي الاعتماد على الفحص الاختياري للمرضى ذوي الخطورة العالية والعلامات السريرية الواضحة للآفة ممن يراجعون قسم طب الفم والجراحة أو المشافي المذكورة مسبقاً مما حد من عدد العينات.

4-1-2. مميزات الدراسة Study Advantages

تجدر الإشارة إلى أنَّ الدراسات المنشورة حديثاً في موضوع سرطان الفم والآفات محتملة الخباثة تتجاوز الصفات السريرية والنسيجية لهذه الآفات، وعلاقتها ببعضها البعض، إلى البحث عن المشعرات الجزيئية التي تساهم في تطور هذه الآفات، ومن هذه المشعرات الجزيئية تقييم عدد نسخ الدنا المتقدري نسبة إلى الدنا النووي في العديد من السرطان ومنها سرطان الثدي، والقولون، وسرطان المرىء، وسرطان الرأس والعنق ومنها سرطان الحنجرة والحفرة الفموية(Afshan N. Malik 2011) (Mondal et al. 2013)، وفي دراستنا هذه تمّ التوجه إلى استخدام هذا الفحص في اللعاب وذلك للتحريّ عن مدى فاعليته في الكشف المبكر عن الآفات الفموية محتملة الخباثة(الطلاوة) والخبيثة(سرطان شائك الخلايا)، ومقارنتها بعينة الشاهد، وتقييم مدى فعالية هذا الفحص أيضاً في إنذار الحالة، وارتباطه بجنس، والمريض، وعمره، والتدخين، وغيرها من المشعرات، وقد تمَّ أخذ عينات لعاب وخزعات نسيجية لآفات محتملة الخباثة بعد التأكد من التشخيص السريري بمساعدة الأستاذ المشرف وطلاب الدراسات العلياء في قسم طب الفم، وذلك لأنه لا يوجد حتى الآن بديلٌ يغني عن الخزعات الجراحية، كما أنَّ هذا الإجراء إلزامي، لكل أطباء الأسنان عند الاشتباه بآفة سريرية محتملة الخباثة فلابد من التأكد منها ومعالجتها قبل التطور إلى مراحل متقدمة. إجمالاً تعتبر الخزعة الجراحية المعيار الذهبي (Kumaraswamy et al. 2012)، وبالتالي الوصول إلى تشخيص دقيق للآفة/المرض إذ تمَّت مقارنة نتائج الخزعة الجراحية بمستويات الدنا المتقدري/الدنا النووي، وبالتالي تمَّ الاعتماد على أُسس واضحة لتقييم فعالية هذا الفحص. كما اعتمد الباحث على تشخيص نتائج الخزعات الجراحية عبر مشرح مرضي واحد دون غيره وذلك لتوحيد معايير التشخيص والحد من عوامل التشويش في العينات

النسيجية، وكانت أكثر الآفات المشخصة سريرياً طلاوة بيضاء وقد اعتمد الباحث عليها وذلك لأن لها نسبة عالية للتحول السرطاني (Ramasubramanian et al. 2013) وتمَّ استثناء الآفات الأخرى، وبالتالي تمَّ توحيد الآفة المدروسة وكذلك الحال بالنسبة لسرطان شائك الخلايا. كما اتبع الباحث في اختيار العينات دراسة حالة- شاهد بالتوافق Matching case – control ، أي إنه تمَّ اختيار حالات الشاهد بما يتوافق مع وصف عينة المرضى من حيث العمر، وكمية السجائر المستهلكة، وغيرها وذلك لتوحيد عوامل التأثير في دنا اللعاب مما يفيد الباحث في تقييم أية فروقات للدنا المتقدري/ الدنا النووي ناتجة فقط عن التغييرات الجزيئية لمرضى الآفات الخبيثة ومحتملة الخباثة دون غيرها (Mondal et al. 2013)، (Jiang et al. 2005) (Afshan N. Malik 2011) .

إنَّ تحديد معايير Standardization تقنية المتابعة اللحظية للتفاعل التسلسلي للبوليميراز Real-Time PCR بهدف تشخيص وحساب عدد نسخ الدنا المتقدري/ الدنا النووي المضخمة خلال التفاعل يتطلب جودة عالية في تصميم Design عديدات النوكليوتيد Oligonucleotide النوعية وحسن اختيارها اوّلاً، وذاك لأنّها تؤثر بقوّةٍ في فعالية Efficiancy وحساسية sensitivity التفاعل، لهذا عمِدَ الباحث إلى اختيار مشارع primer ومسابر probe نوعية لتضخيم منطقة الهدف دون غيرها حيث تضخم منطقة محافظة Conserve- منطقة لايحدث فيها طفرات-، رغم التكلفة الباهظة وذلك لضمان دقة النتائج(Afshan N. Malik 2011)، كما بذلَ الباحث جهداً ووقتاً في تصميم العياري Standard بمساعدة مخبر مشفى الأسد الجامعي ومركز التقانات الحيوية، إذ تمَّ الحصول على عياري ذي دقة عالية لضمان جودة النتائج؛ أي إنه تصنيع داخلي دون الاحتياج للاستيراد الخارجي.

كذلك تمَّ تكرار بعض العينات ثلاث مرات في تجارب مختلفة للتأكد من دقة نتائج الدراسة، كما تمَّ استخدام NTC (Negative template control) و Positive Control في كل تفاعل لضمان نقاوة التفاعل وعدم حدوث أي تلوث للعينات مع بعضها البعض.

4-1-3. مناقشة النتائج:

شملت دراستنا ثلاث مجموعات(control 21 ,leukoplakia 20 ,oscc 17)، 28.3 % للآفات الخبيثة، و36.7% للآفات محتملة الخباثة، و35.0% لحالات الشاهد. وكان متوسط أعمار مرضى الآفات الفموية الخبيثة 52.8، والآفات محتملة الخباثة 46.3، والحالات الشاهد 43.7، والمتوسط الحسابي لعينة البحث كاملةً 47.2%، وكانت نسبة الذكور/الاناث في الآفات الخبيثة (64.7، 35.3)، والآفات محتملة الخباثة(77.3، 22.7)، وحالات الشاهدة(61.9، 38.1)، وعينة البحث كاملة(68.3، 31.7)، أما بالنسبة للمرضى غير المدخنين (مرضى الآفات الفموية الخبيثة 29.4%، والآفات محتملة الخباثة 27.3%، والحالات الشاهد 42.9%)، وعينة البحث كاملة 33.3%، والمرضى المدخنين (مرضى الآفات الفموية الخبيثة 70.6%، والآفات محتملة الخباثة 72.7%، والحالات الشاهد 57.1)، وعينة البحث كاملة 66.7%.

اختلفت دراستنا مع الدراسات المذكورة ادناه في حجم وتوزع العينة، وكانت الدراسات تتألف من مجموعتين فشملت دراسة جانج وزملاءة(Jiang et al. 2005) (HNSC 94,control 656)، ودراسة ماندال وزملاءة (Mondal et al. 2013) (140 control، 124 oscc)، ودراسة دانج وزملاءة (Dang et al. 2014)، (control 40، ca204)، ودراسة مسايسفا وزملاءة (Masayesva et al. 2006)(604 مدخن إناث وذكور)، ودراسة إكسو وزملاءة (Xu et al. 2013)(control218، ca218)، توافقت دراستنا مع دراسة كيم وزملاءة (Kim et al. 2004) من حيث توزع مجموعات الدراسة ولكنها اختلفت أيضاً في حجم العينة(control 655، premalignant 91، ca 14)، كما اختلفت دراستنا مع هذه الدراسة في نوعية الآفات محتملة الخباثة وعددها إذ شملت هذه الدراسة جميع الآفات محتملة الخباثة وكان ناتج التشريح المرضي(18 سوء تصنع خفيف، و32 سوء تصنع معتدل، 41 سوء تصنع شديد) بما يعطي قوة للدراسة من النواحي النسيجية ولكنة تمَّ إضعاف الدراسة وزيادة عوامل التشتت لمعايرة الدنا المتقدري/ الدنا النووي إذ يحوي حالات سريرية مختلفة، بينما في دراستنا تمَّ التحديد من قِبل الباحث والمشرف على آفة واحدة فقط وتعتبر الأكثر انتشاراً كما تحوي عامل خطورة عالياً للتحول السرطاني، وبالتالي تمَّ التقليل من عوامل التشويش في البحث.

توافقت دراستنا مع دراسة جانج وزملاءة وماندال وزملاءة ومسايسفا وزملاءة وكيم وزملاءة (Jiang et al. 2005)، (Mondal et al. 2013)، (Masayesva et al. 2006) (Kim et al. 2004) من حيث طبيعة العينة الماخوذة إذ كانت عينة لعاب ولكنها اختلفت من حيث

طريقة أخذ العينة (غسول فموي، مسحةswab، غسول فموي+ فرشاه)، كما توافقت ايضاً دراسة كيم وزملاءة(Kim et al. 2004) مع دراستنا وذلك بأخذ خزعات نسيجية لمقارنه نتائج مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي بنتائج التشريح المرضي، واختلفت دراستنا مع دراسة دانج وزملاءة(Dang et al. 2014) في طبيعة العينة المأخوذة من المرضى إذ كانت خزعات نسيجية لآفات خبيثة في الحنجرة؛ أحد أنواع سرطان الرأس والعنق، واختلفت أيضاً مع دراسة إكسو وزملاءة (Xu et al. 2013) إذ كانت العينات المأخوذة من دم Blood لعينات مرضى سرطانات غدية في المرىء Esophageal Adenocarcinoma؛ وتعتبر أحد أنواع السرطان شائك الخلايا، ولكن اتفقت دراستنا مع هذه الدراسة في طريقه ومعايرة مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي،

كما اختلفت دراستنا مع الدراسات المذكورة في متوسط أعمار المرضى فهي تزيد عن دراستنا بفارق وسطي بلغ10−15 عاماً تقريباً للآفات الخبيثة، والحالات الشاهدة بفارق يقدر بـ10±20 عاماً، و لوحظت علاقة في هذه الدراسات بين ارتباط مستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي وعمر المريض، وبما أنَّ عدد نسخ الدنا المتقدري يتضاعف بازدياد العمر(Kim et al. 2004)،(Jiang et al. 2005) فقد يكون الفرق الجوهري بين مجموعات الدراسة المذكورة وهذه الدراسة عائداً إلى فارق العمر ، وقد يعود ذلك إلى حدوث طفرات في أحد الجينات المرمزة للسلسلة التنفسية وبالتالي يؤدي إالى زيادة عدد نسخ الدنا المتقدري وتوافقت دراستنا مع دراسة ماندل وزملاءة (Mondal et al. 2013)، إذ لا توجد أية دلالة إحصائية لارتباط العمر بمستوى الدنا، وقد يرجع السبب إلى تطابق نوعية السرطان في هذه الدراسة وفي دراستنا؛ أذ كان سرطان شائك الخلايا في الحفرة الفموية.

كما اختلفت هذه الدراسة مع دراسة ماندال وزملاءة ودانج وزملاءة(Mondal et al. 2013; Dang et al. 2014)، إذ ترتفع مستويات الدنا المتقدري/الدنا النووي في المراحل الأولى للسرطان بينما تنخفض في المراحل المتقدمة، أما في دراستنا فلا توجد علاقة جوهرية عند مستوى دلاله 0.05.

كما لوحظ في هذه الدراسة ارتفاع مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي في حالات المرضى محتملة الخباثة بتقدم العمر مما قد يفسر ذلك إلى زيادة انتاجROS بتقدم العمر في هذه المجموعة وبالتالي حدوث طفرات في أحد الجينات المرمزة للسلسلة التنفسية وبالتالي زيادة عدد نسخ الدنا المتقدري، كما لوحظ في الحالات الخبيثة عدم وجود علاقة بين العمر ومستويات الدنا المتقدري حيث اظهرت بعض الدراسات أن المراحل الأولية من السرطان يلاحظ ارتفاع في مستويات الدنا المتقدري ولكن المراحل المتقدمة يلاحظ انخفاض ملحوظ في عدد نسخ الدنا

المتقدري/ الدنا النووي (Mondal et al. 2013) وقد يفسر ذلك إلى حدوث طفرات في منطقة D-LOOP فحدوث طفرة في هذه المنطقة يؤثر فعلياً في نقص عدد نسخ الدنا المتقدري(Verschoor et al. 2013) ولكن في هذه الدراسة كانت معظم الحالات(13) في مراحل متقدمة بينما العينات الاربع المتبقاه كانت في مراحل مبكرة، فهل ياترى الاختلاف في مراحل السرطان لدى هذه الدراسة والدراسات المذكورة هو سبب وراء عدم وجود نتائج ملحوظه لتمييز أية علاقة ارتباط بين المشعرات المدروسة ومستويات الدنا المتقدري ومنها العمر.

كما اتفقت دراستنا مع دراسة جيانج وزملاءة وماندال وزملاءة وماسيسفا وزملاءة وكيم وزملاءة (Jiang et al. 2005)، (Mondal et al. 2013)، (Masayesva et al. 2006) (Kim et al. 2004) من حيث أنَّ نسبة الذكور أكثر من الإناث، يُمكن تفسير ذلك بأن عدد الذكور الذين راجعوا قسم طب الفم خلال فترة هذه الدراسة كان أكثر من عدد الإناث، و/أو أنَّ الذكور أكثر عُرضة للإصابة بالآفات الفموية الخبيثة و/أو محتملة الخباثة، يُعزى هذا التباين بين الجنسين إلى عادة التدخين، فقد أظهرت النتائج أن نسبة المدخنين من الذكور كانت أعلى من نسبة الإناث، أمَّا بالنسبة لمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي فلا توجد أية علاقة ذات دلالة إحصائية مقارنة بالدراسات السابقة، بإستثناء دراسة ماندال وزملاءة حيث توافقت النتائج مع نتائج هذه الدراسة إذ لايوجد أي ارتباط بين الجنس ومستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي، اختلفت دراستنا مع جيانج وزملاءة وماندال وزملاءة وماسيسفا وزملاءة وكيم وزملاءة (Jiang et al. 2005)، (Mondal et al. 2013)، (Masayesva et al. 2006) (Kim et al. 2004)، إذ لوحظت في الدراسات المذكورة فروقات ذات دلالة إحصائية وذلك بارتفاع مستوى الدنا بين المدخنين بمقارنة بغير المدخنين، كما اختلفت هذه الدراسة مع دراسة دانج وزملاءة (Dang et al. 2014) التي انخفض فيها مستوى الدنا المتقدري /الدنا النووي في المرضى المدخنين مقارنة بغير المدخنين، بينما في دراستنا لا توجد أية علاقة بين التدخين ومستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي فقد يعود ذلك إلى فارق حجم العينة. كما اختلفت دراستنا مع دراسة إكسو وزملاءة (Xu et al. 2013) ، حيث انخفض مستوى الدنا المتقدري /الدنا النووي في حالات السرطان مقارنة بحالات الشاهدة في كلّ من مشعر الجنس، والعمر، والتدخين، و قد يُعزى هذا الاختلاف إلى اختلاف موقع الورم (المرىء) وطبيعة العينة التي تشمل عينة دم .

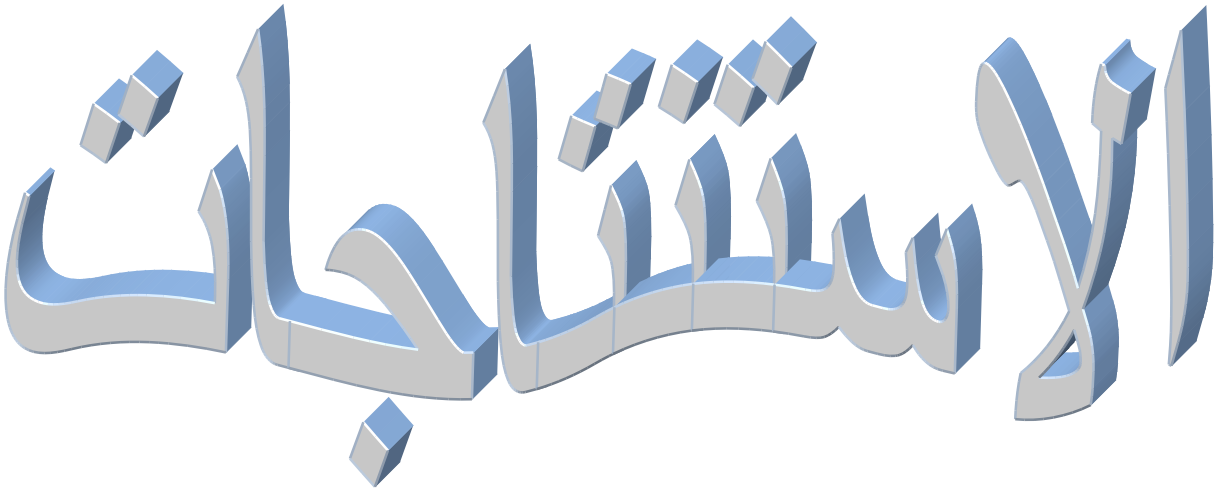
اختلفت دراسة جيانج وزملاءة وكيم وزملاءة (Jiang et al. 2005)، (Kim et al. 2004) مع دراستنا إذ كان مستوى الدنا المتقدري / الدنا النووي في الآفات الخبيثة مرتفعاً في كل مراحلة؛ كلما ازداد السرطان تقدماً ارتفع مستوى الدنا المتقدري /الدنا النووي مقارنة بمجموعة الشاهدة، كما اختلفت دراسة كيم وزملاءة(Kim et al. 2004) مع هذه الدراسة وذلك بارتفاع

مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي في اللعاب ومقارنته بكل مراحل التصنيفات النسيجية للآفات محتملة الخباثة ،كما تميزت هذه الدراسة عن دراستنا بعدم الاكتفاء بالتصنيفات النسيجية فحسب وإنما التحرَّي عن مستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي في الخزعات النسيجية ومقارنتها بمستوياته في اللعاب، ولم يتوجه الباحث إلى هذه الطريقة بسبب التكلفة الباهظة للبحث فقد كانت من أهم عوائق البحث إذ يحتاج الباحث عتيدة خاصة لعزل الدنا من النسيج.

مما ذكر سابقاً يلاحظ تضارب النتائج واختلافها بين دراسة وأخرى ولا يوجد حتى الآن دراسات متبثة بهذا المجال، ويرجع سبب الاختلاف الرئيسي بين هذه الدراسات وهذه الدراسة لطريقة أخذ العينة فالغسول الفموي أو المسحة يشمل خلايا عديدة ومختلفة منها الخلايا الظهارية التقشرية Exfoliated Epithelial Cell، وبعض الخلايا المناعية، كما أنَّ عينة الدم تحوي كمية هائلة من الخلايا مقارنة باللعاب، بينما في هذه الدراسة تمَّ أخذ عينة بصاق Spit من المرضى، وذلك لأن هدف الباحث معايرة مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي في الخلايا المطلقة من الورم إلى اللعاب دون غيرها والتقليل من كمية الخلايا الأخرى، وكذلك الحال بالنسبة لدراسة دانج وزملاءة(Dang et al. 2014) فقد اعتمد على الخزعات النسيجية، ولكن هدف الباحث تقييم اللعاب في الكشف المبكر للسرطان، وتجنب الرض النفسي للمريض، إذ إنَّ اللعاب بالتصاق مباشر مع سرطان الحفرة الفموية(Farnaud et al. 2010) وقد يعود ايضاً الاختلاف بين هذه الدراسة والدراسات المذكورة إلى فارق في حجم العينة، والتأهب بالإصابة نتيجة عامل العرق.

وفق نتائج هذه الدراسة التشخيصية وغيرها من الدراسات يتضح جليَّاً أنَّه لا غنى عن الخزعة الجراحية، وأنها الوسيلة الأدقُّ والمعيار الذهبي في الحكم على ماهية الآفات المشكوك فيها سريرياً.

الباب الخامس



1- لا توجد أية فروقات ذات دلالة إحصائية بين مستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي في الآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة وحالات الشاهد.

2- لا توجد أية علاقة ذات دلالة إحصائية بين مستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي وجنس المريض.

3- لاتوجد أي علاقة ذات دلالة احصائية بين قيم عمر المريض وقيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي في عينة البحث كاملة.

4- تواجد فروقات ذات دلالة احصائية بين قيم عمر المريض وقيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي في الحالات محتملة الخباثة.

5- لا توجد أية علاقة بين دراسة تأثير عادة التدخين في قيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي.

6- لا توجد أية علاقة بين قيم درجة الإصابة بالآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة وقيم المتغيرات المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي.

7- الخزعات النسيجية المعيار الذهبي على الآفات المشكوك بها.

الباب السادس

6-1. المقترحات

1. إجراء دراسة أشمل وبحجم عينة أكبر لتقييم القيم المتعلقة بمستوى الدنا المتقدري/الدنا النووي.
2. إجراء دراسة نسيجية للدنا إلى جانب اللعاب لتقييم مدى فعالية فحص مستوى الدنا المتقدري/ الدنا النووي في الكشف المبكر على الآفات الخبيثة ومحتملة الخباثة للتأكد من فعالية هذا الفحص في اللعاب.
3. إجراء دراسة متابعة لمرضى سرطان الفم.
4. إجراء دراسة متابعة لمرضى الآفات الفموية الخبيثة ومحتملة الخباثة في مراحلها المبكرة للوقوف على العوامل المتعلقة بتطور هذه الآفات.

6-2.التوصيات:

1. تفعيل برامج وقاية أولية وثانوية تستهدف المجتمع ككل، وتركز على استهداف أفراد مجموعة الخطر العالي.
2. تطوير التقنية المستخدمة.
3. استخدام التقنية بتصميم دراسة مختلف.

الباب السابع

المراجع

References

Abhimanyu Mohanta PKMaGP. Human oral squamous cell carcinoma (OSCC) in Odisha: A hospital-based study. Advances in Applied Science Research 2013; **4:** 124-132.

Afshan N. Malik RS, Ana Rodriguez-de-Ledesma, Abas Laftah, Phil Cunningham. Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. Biochemical and Biophysical Research Communications 2011; **412:** 1-7.

Ahmadi Motamayel FD, P. Dalband, M. Hendi, S.S. Saliva as a Mirror of the Body Health. DJH 2010; **1:** 1-15.

Alessandra Maresca PsMR. Pathogenetic mechanisms in mitochondrial optic neuropathies: (2011)

Ali FM, Aher V, Prasant MC, Bhushan P, Mudhol A, Suryavanshi H. Oral submucous fibrosis: Comparing clinical grading with duration and frequency of habit among areca nut and its products chewers. J Cancer Res Ther 2013; **9:** 471-476.

Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. Annu Rev Med 2012; **63:** 199-215.

Anand Kumar LC, James A. McCaul, Cyrus J. Kerawala ,, Darryl Coombes DG, Peter A. Brennan. How should we manage oral leukoplakia? British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2013; **51:** 377-383.

Ashok Shinde JG, Pankaja Naik. Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. Journal of Dental & Allied Sciences 2012; **1:** 63-66.

Auluck A, Rosin MP, Zhang L, Sumanth KN. Oral submucous fibrosis, a clinically benign but potentially malignant disease: report of 3 cases and review of the literature. J Can Dent Assoc 2008; **74:** 735-740.

AYGAN A. Nucleic Acid Extraction from Clinical Specimens for PCR Applications. TBÜTAK 2006; **30:** 107-120.

Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. Oral Oncol 2010; **46:** 414-417.

Bar T, Kubista M, Tichopad A. Validation of kinetics similarity in qPCR. Nucleic Acids Res 2012; **40:** 1395-1406.

Bhurgri Y, Bhurgri A, Usman A, Pervez S, Kayani N, Bashir I et al. Epidemiological review of head and neck cancers in Karachi. Asian Pac J Cancer Prev 2006; **7:** 195-200.

Bianca de Fátima Borim Pulino JFMdS, Gabriel Pires Pastore, Patrícia Radaic,, Geraldo Prestes de Camargo Filho RAP. Oral cancer: potentially malignant lesions and statistics of diagnosed cases in the municipality of Santo André-SP. J Health Sci Inst 2011; **29:** 231-234.

Bianca de Fátima Borim Pulino JFMdS, Gabriel Pires Pastore, Patrícia Radaic, Geraldo Prestes de Camargo Filho, Renato Alves Pereira. Oral cancer: potentially malignant lesions and statistics of diagnosed cases in the municipality of Santo André-SP. 2011; **29:** 231-234.

Birch LAKaDE. Polymerase Chain Reaction. In: Janes B-YCaHW, ed. Methods in Molecular Biology,PCR Cloning Protocols(Second Edition edn). 999 Riverview Drive, Suite 208

Totowa, New Jersey 07512: © 2002 Humana Press Inc.; (2002): 4.błony Mslwlzlp, ustnej śj. Topical Application of Drugs Used in Treatment of Oral Lichen Planus

Lesions. Department of Periodontology, Oral Pathology, Wrocław Medical University 2013; **22:** 893-898.

Boy SC. Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa--a brief overview. SADJ 2012; **67:** 558-560. Brooks G. The polymerase chain reaction (PCR): general applications and potential for clinical use In: brooks G, ed. biotechnology in healthcare, An introduction to biopharmaceuticals. 1 Lambeth High Street, London SE1 7JN: the Pharmaceutical Press; (1998): 67-68.

BruceA lberts Ah, JulianL ewis,Martin Raff,Keith Roberts,PeteWr alter. Manipulating Proteins DNA,and RNA. In: Granum MAaS, ed. molecular biology of the cell, (fifth edition edn). Published by Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business, 270 Madison Avenue, NewYork NY f 0016, USA, and 2 park Square, Milton park,

Abingdon, OXl4 4RN, UK.: Jackie Harbor; (2008a): 544. BruceA lberts Ah, JulianL ewis,Martin Raff,Keith Roberts,PeteWr alter. Molecular Biology of cell (Fifth Edition edn), Garland science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business, 270 Madison Avenue, NewYork NY f 0016, USA, and 2 park Square, Milton park, Abingdon, OXl4 4RN, UK.,

Jackie Harbor (2008b). 813 Brzak BL, Mravak-Stipetic M, Canjuga I, Baricevic M, Balicevic D, Sikora M et al. The frequency and malignant transformation rate of oral lichen planus and leukoplakia--a retrospective study. Coll Antropol 2012; **36:** 773-777.

Canto AM, Muller H, Freitas RR, Santos PS. Oral lichen planus (OLP): clinical and complementary diagnosis. An Bras Dermatol 2010; **85:** 669-675.

Carrard VC, Brouns ER, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2013; **18:** e411-413.

Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. Acta Otorhinolaryngol Ital 2011; **31:** 347-357.

Cervigne NK, Machado J, Goswami RS, Sadikovic B, Bradley G, Perez-Ordonez B et al. Recurrent genomic alterations in sequential progressive leukoplakia and oral cancer: drivers of oral tumorigenesis? Hum Mol Genet 2014; **23:** 2618-2628.

Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2013; **61:** 43-58.

Chatre L, Ricchetti M. Prevalent coordination of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication with the cell cycle. Nucleic Acids Res 2013; **41:** 3068-3078.

Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D. Mitochondrial subversion in cancer. Cancer Prev Res (Phila) 2011; **4:** 638-654.

Cheng YS, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. Clin Transl Med 2014; **3:** 3.

Chiu CC, Chen BH, Hour TC, Chiang WF, Wu YJ, Chen CY et al. Betel quid extract promotes oral cancer cell migration by activating a muscarinic M4 receptor-mediated signaling cascade involving SFKs and ERK1/2. Biochem Biophys Res Commun 2010; **399:** 60-65.

chris de souza up, pankaj chaturvedi. precancerous lesion of oral cavity. otorhinolaryngology clinic : An inernational journal 2009; **1:** 7-14.

cornel mulhardt tbEWb, M.D.munich. The Polymerase Chain Reaction. molecular biology and genomics. Academic Press is an imprint of Elsevier 30 Corporate Drive, Suite 400, Burlington, MA 01803, USA 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA 84 Theobald's Road, London WC1X 8RR, UK: (2007): 65.

Cox S, Vickers ER, Ghu S, Zoellner H. Salivary arecoline levels during areca nut chewing in human volunteers. J Oral Pathol Med 2010; **39:** 465-469.

D Sujatha PBH, Anuradha Pai. Prevalence and Correlation of Oral Lesions among Tobacco Smokers, Tobacco Chewers, Areca Nut and Alcohol Users. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012; **13:** 1633-1637.

Dang S, Qu Y, Wei J, Shao Y, Yang Q, Ji M et al. Low copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in early-stage laryngeal cancer patients. Diagn Pathol 2014; **9:** 28.

Dasgupta S, Dash R, Das SK, Sarkar D, Fisher PB. Emerging strategies for the early detection and prevention of head and neck squamous cell cancer. J Cell Physiol 2012; **227:** 467-473.

Dasgupta S, Koch R, Westra WH, Califano JA, Ha PK, Sidransky D et al. Mitochondrial DNA mutation in normal margins and tumors of recurrent head and neck squamous cell carcinoma patients. Cancer Prev Res (Phila) 2010; **3:** 1205-1211.

Davila AF, Zamorano P. Mitochondria and the evolutionary roots of cancer. Phys Biol 2013; **10:** 026008.

Dean Fraga TM, and Steven Fenster. Real-Time PCR. Current Protocols Essential Laboratory Techniques 2008.

Debray FG, Lambert M, Mitchell GA. Disorders of mitochondrial function. Curr Opin Pediatr 2008; **20:** 471-482.

Dhariwal R, Ray JG, Pattanayak SM, Swain N. Oral submucous fibrosis: a report of two pediatric cases and a brief review. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2012; **30:** 85-88.

Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. Cancer Metastasis Rev 2005; **24:** 9-17.

Dominique Quinque RK, Manfred Kayser , Mark Stoneking, Ivan Nasidze Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. Analytical Biochemistry 2006; **353:** 272-277.

Dr.Mohini Joshi Ddjd. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. International Journal of Biomedical Research 2010; **1:** 81-97.

Eberhard Passarge M. Color Atlas of Genetics (Third edition edn), Stuttgart · New York Thieme (2007).

Elizabeth van Pelt-Verkuil AvB, John P. Hays. PCR Primers Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science + Business Media B.V. 2008; (2007a): 63.

Elizabeth van Pelt-Verkuil AvB, John P. Hays. The Polymerase Chain Reaction. principles and technical aspect of pcr amplification. © 2008 Springer Science + Business Media B.V.; (2007b): 1-2.

Elizabeth van Pelt-Verkuil AvB, John P. Hays,John P. Hays. The PCR in Practice. Principles and Technical Aspectsof PCR Amplifi cation. 2008 Springer Science + Business Media B.V.; (2007c): 17.

Farnaud SJ, Kosti O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: physiology and diagnostic potential in health and disease. ScientificWorldJournal 2010; **10:** 434-456.

References

المراجع

Farzeen Tanwir HA. Oral Submucous Fibrosis:A Chronic Deliberating Disease of Oral Cavity. Iranian Journal of Pathology 2011; **6:** 165-172.

Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. Exp Physiol 2003; **88:** 41-56.

Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. Braz J Otorhinolaryngol 2013; **79:** 239-247.

Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. Cancer Metab 2014; **2:** 10.

Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suarez C, Owen RP et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. Eur Arch Otorhinolaryngol 2010; **267:** 1001-1017.

George Laskaris MD, D.D.S., Ph.D. White Lesions. Pocket Atlas of Oral Diseases (2nd ed. edn). (2006): 1-40.

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? Trends Cell Biol 2008; **18:** 165-173.

Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. Mutat Res 2007; **635:** 105-117.

Gorouhi F, Davari P, Fazel N. Cutaneous and mucosal lichen planus: a comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. ScientificWorldJournal 2014; **2014:** 742826.

Gouvea AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. J Oral Pathol Med 2010; **39:** 447-452.

Goyal D GP, Singh HP, Verma C. An Update On Precancerous Lesions Of Oral Cavity. 2013; **2:** 70-75.

Guarnaccia M, Gentile G, Alessi E, Schneider C, Petralia S, Cavallaro S. Is this the real time for genomics? Genomics 2014; **103:** 177-182.

Habbal W. Standardization Of Human Cytomegalovirus Real-Time PCR [master Damascus University, Damascus (2006)

Hanken H, Kraatz J, Smeets R, Heiland M, Assaf AT, Blessmann M et al. The detection of oral pre- malignant lesions with an autofluorescence based imaging system (VELscope) - a single blinded clinical evaluation. Head Face Med 2013; **9:** 23. Henry NL, Hayes DF. Cancer biomarkers. Mol Oncol 2012; **6:** 140-146.

Hertrampf K, Wiltfang J, Katalinic A, Timm O, Wenz HJ. Trends in incidence, tumour sites and tumour stages of oral and pharyngeal cancer in Northern Germany. J Cancer Res Clin Oncol 2012; **138:** 431-437.

Higuchi M. Roles of Mitochondrial DNA Changes on Cancer Initiation and Progression. Cell Biol (Henderson, NV) 2012a; **1**.Higuchi M. Roles of Mitochondrial DNA Changes on Cancer Initiation and Progression. Cell Biolog Research & Therapy 2012b; **2012:** 1-2.

Hinestrosa MC, Dickersin K, Klein P, Mayer M, Noss K, Slamon D et al. Shaping the future of biomarker research in breast cancer to ensure clinical relevance. Nat Rev Cancer 2007; **7:** 309-315.

Hussain Gadelkarim Ahmed BS, M.Sc., Ph.D., Syda Omer M. Ali Ebnoof, (Honor. B.Sc.), , Mohmmed Omer M. Hussein BS, M.Sc., and Afra Yousif A. Gbreel, (Honor. B.Sc.),. Oral Epithelial Atypical Changes in Apparently Healthy Oral Mucosa

Exposed to Smoking, Alcohol,Peppers and Hot Meals, Using the AgNOR and Papanicolaou Staining Techniques. 2009; **38:** 489-495.

Issrani R, Prabhu N, Keluskar V. Oral proliferative verrucous leukoplakia: A case report with an update. Contemp Clin Dent 2013; **4:** 258-262.

J PKR. Potentially malignant lesion – oral leukoplakia. Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences 2012; **1:** 286-291.

Jamie L Penner SEM, Jo-Ann V Sawatzky. management of dysphagia in advanced oropharyngeal cancer. internattional journal of palliative nursing 2007; **13:** 206-212. Jan Koolman K-HR. Color Atlas of Biochemistry (2nd edition edn), Stuttgart · New York, Thieme (2005).

Jean-François Dumas DRaSS. Mitochondria and cancer. Cellular Bioenergetics in Health and Diseases 2012a**:** 115-147.

Jean-François Dumas DRaSS. Mitochondria and cancer, (2012b). 115-147

Jeremy M.BERG JLT, lubert Stryer. Biochemistry (fifth edition edn), (2002).

Jerry E. Bouquot D, MSD1 • Patricia Suarez, DDS, MS2, Nadarajah Vigneswaran B, DMD. Oral Precancer and Early Cancer Detection in the Dental office – Review of New Technologies. The Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry 2010; **2:** 47-63.

Jerry E. Bouquot PMS, Paula M. Farthing. Epithelial dysplasia of the oral mucosa—Diagnostic problems and prognostic features. Current Diagnostic Pathology 2006; **12:** 11-21.

Jezierska-Drutel A, Rosenzweig SA, Neumann CA. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. Adv Cancer Res 2013; **119:** 107-125.

Jiang WW, Masayesva B, Zahurak M, Carvalho AL, Rosenbaum E, Mambo E et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. Clin Cancer Res 2005; **11:** 2486-2491.

Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. Periodontol 2000 2011; **57:** 19-37.

josephine S . Modica-Napolitano MKaKKS. Mitochondrial and humen cancer. current molecular medicine 2007; **7:** 121-131.

Joshi P, Dutta S, Chaturvedi P, Nair S. Head and neck cancers in developing countries. Rambam Maimonides Med J 2014; **5:** e0009.

JP Rajguru KM, TS Thirugnanasambandan, N Aravindha Babu. Programmed Self-cell Suicide (Apoptosis) – Current Review,

Concepts and Future Prospects. Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry 2012; **2:** 500-501.

Juliana Hintz Germanos Scheidt LSY, Karen Cherubini, Maria Antonia Z. de Figueiredo, Fernanda Gonçalves Salum. Characteristics of oral squamous cell carcinoma in users or non users of tobacco and alcohol. Rev Odonto Cienc 2012; **27:** 69-73.

Jung-Il Chae RL, JinHyoung Cho, JinTae Hong and Jung-Hyun Shim2014. Specificity protein 1 is a novel target of 2, 4-bis (p-hydroxyphenyl)-2-butenal for the suppression of human oral squamous cell carcinoma cell growth. Journal of Biomedical Science 2014; **21:** 1.

Kalimuthu S, Se-Kwon K. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: marine bioactive compounds. Int J Mol Sci 2013; **14:** 2334-2354.

References

Kassem AM, El-Guendy N, Tantawy M, Abdelhady H, El-Ghor A, Abdel Wahab AH. Mutational hotspots in the mitochondrial D-loop region of cancerous and precancerous colorectal lesions in Egyptian patients. DNA Cell Biol 2011; **30:** 899-906.

Kavlick MF, Lawrence HS, Merritt RT, Fisher C, Isenberg A, Robertson JM et al. Quantification of human mitochondrial DNA using synthesized DNA standards. J Forensic Sci 2011; **56:** 1457-1463.

Keshav K. Singh lCC. mitochondria and cancer, springer science (2009).

Khalili J. Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. Exp Oncol 2008; **30:** 259-264.

Kim MM, Clinger JD, Masayesva BG, Ha PK, Zahurak ML, Westra WH et al. Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. Clin Cancer Res 2004; **10:** 8512-8515.

Kujoth GC, Bradshaw PC, Haroon S, Prolla TA. The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. PLoS Genet 2007; **3:** e24.

Kulawiec M, Owens KM, Singh KK. Cancer cell mitochondria confer apoptosis resistance and promote metastasis. Cancer Biol Ther 2009; **8:** 1378-1385.

Kumaraswamy KL, Vidhya M, Rao PK, Mukunda A. Oral biopsy: oral pathologist's perspective. J Cancer Res Ther 2012; **8:** 192-198.

Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. Eur J Gastroenterol Hepatol 2011; **23:** 633-641.

Lan Q, Lim U, Liu CS, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. Blood 2008; **112:** 4247-4249.

Lee HC, Wei YH. Mitochondrial DNA instability and metabolic shift in human cancers. Int J Mol Sci 2009; **10:** 674-701.

Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent 2009; **22:** 241-248.

Lemmer LFaJ. Oral Leukoplakia as It Relates to HPV Infection: A Review. International Journal of Dentistry 2012**:** 1-7.

Leon Barnes MDaJLH, M.D. squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx:A review of current data. sroms 2000; **11:** 5.

Leon Barnes MDaJLH, M.D. SQUAMOUS CELL CARINOMA OF THE ORAL CAVITY AND OROPHARYNX: A REVIEW OF CURRENT DATA. 2003; **11:** 1-60.

Li Q. STUDIES ON THE MECHANISMS OF CARCINOGENESIS AND CANCER CELL DEATH Karolinska Institutet, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden: (2013)

Li W ZJ, Zeng J, Wang L,Kharaziha P,Rodriguez P. STUDIES ON THE MECHANISMS OF CARCINOGENESIS AND CANCER CELL DEATH: (2013)

Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. Clin Cancer Res 2004; **10:** 8442-8450.

Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC. Saliva: reflection of the body. Int J Infect Dis 2010; **14:** e184-188.

Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. Oral Oncol 2008; **44:** 10-22.

References

المراجع

Linneu Cuffari D, McS,a José Tadeu Tesseroli de Siqueira, DDS, PhD,b Katia Nemr, PhD,c, and Abrão Rapaport M, PhD,d São Paulo, Brazil. Pain complaint as the first symptom of oral cancer:

A descriptive study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; **102:** 56-61.

Little MA, Pokhrel P, Murphy KL, Kawamoto CT, Suguitan GS, Herzog TA. The reasons for betel-quid chewing scale: assessment of factor structure, reliability, and validity. BMC Oral Health 2014; **14:** 62.

Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JQ, Yang X, Li J et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. PLoS One 2012; **7:** e34773.

Liviu Feller JL. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. Journal of Cancer Therapy 2012; **3:** 263-268.

Lodi G SA, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia (Review). The Cochrane Collaboration 2008**:** 1-29.

Ma W, Lager KM, Richt JA, Stoffregen WC, Zhou F, Yoon KJ. Development of real-time polymerase chain reaction assays for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies and gene-deleted vaccine viruses. J Vet Diagn Invest 2008; **20:** 440-447.

Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RA, Schouten LJ. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. BMC Cancer 2014; **14:** 187.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 2002; **30:** 1292-1305.

mader ss. biology (NINTH EDITION edn), Inc.,1221 Avenue of the Americas, new york, NY 10020 McGraw-Hill, business unit of the McGraw-Hill companies (2007). 64-65-68-75-227-230

Majeed Rana AZ, Marco Kuehle, Nils-Claudius Gellrich, Eckardt aAM. Clinical evaluation of an autofluorescence diagnostic device for oral cancer detection: a prospective randomized

diagnostic study. European Journal of Cancer Prevention 2011; **00:** 1-7.

Malathi N, Mythili S, Vasanthi HR. Salivary diagnostics: a brief review. ISRN Dent 2014; **2014:** 158786.

Małgorzata Radwan-Oczko MM. Differential diagnosis of oral leukoplakia and lichen planus – on the basis of literature and own observations. J Stoma 2011; **64:** 355-370.

Markopoulos AK. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. Open Dent J 2012; **6:** 126-130.

Markopoulos AK, Michailidou EZ, Tzimagiorgis G. Salivary markers for oral cancer detection. Open Dent J 2010; **4:** 172-178.

Masayesva BG, Mambo E, Taylor RJ, Goloubeva OG, Zhou S, Cohen Y et al. Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; **15:** 19-24.

Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; **102:** 67-76.

McCullough MJ, Prasad G, Farah CS. Oral mucosal malignancy and potentially malignant lesions: an update on the epidemiology, risk factors, diagnosis and management. Aust Dent J 2010; **55 Suppl 1:** 61-65.

References

المراجع

McKinney N. Mitochondrial Rescue - Turning cancer cells off. Integrated Healthcare Practitioners magazine 2011**:** 78-81.

Mehrotra R, Gupta DK. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. Head Neck Oncol 2011; **3:** 33.

Mehrotra R, Mishra S, Singh M, Singh M. The efficacy of oral brush biopsy with computer-assisted analysis in identifying precancerous and cancerous lesions. Head Neck Oncol 2011; **3:** 39.

Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. Indian J Cancer 2006; **43:** 60-66.

Messadi DV. Diagnostic aids for detection of oral precancerous conditions. Int J Oral Sci 2013; **5:** 59-65.

Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. Oral Oncol 2010; **46:** 411-413.

Michelle L. Boland AHCaKFM. Mitochondrial dysfunction in cancer. Mitochondrial dysfunction in cancer 2013; **3:** 1.

Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. Oral Oncol 2012; **48:** 578-584.

Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer. Curr Mol Med 2007; **7:** 121-131.

Mondal R, Ghosh SK, Choudhury JH, Seram A, Sinha K, Hussain M et al. Mitochondrial DNA copy number and risk of oral cancer: a report from Northeast India. PLoS One 2013; **8:** e57771.

Nair DR, Pruthy R, Pawar U, Chaturvedi P. Oral cancer: Premalignant conditions and screening--an update. J Cancer Res Ther 2012; **8 Suppl 1:** S57-66.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. J Oral Pathol Med 2008; **37:** 1-10.

Nicolás Bolesina FLF, Silvia A. López de Blanc RAMaMAO. Oral Squamous Cell Carcinoma Clinical Aspects In: Ogbureke DKUE, ed. Oral Cancer. InTech; (2012): 388.

Okafor N. Aspects of Molecular Biology and Bioinformatics of Relevance in Industrial Microbiology and Biotechnology. modern industrial microbiology and biotechnology. Post Office Box 699 Enfield, New Hampshire 03748 United States of America: SCIENCE PUBLISHERS An imprint of Edenbridge Ltd., British Isles; (2007): 39-40.

Otera H, Mihara K. Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. Int J Cell Biol 2012; **2012:** 821676.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif 2012; **45:** 487-498.

Panwar SK1 BA. Precancerous Oral Lesions: A Review. Journal of Oral Health Community Dentistry 2013; **7:** 119-126.

Pardeep Goyal DG, Imtiyaz Nadaf,, Ashish Aggarwal IG. Potentially Malignant Disorders: An Update. Journal of Dental Esthetic and Function 2012; **1:** 30-34.

Park S, Jee SH, Shin HR, Park EH, Shin A, Jung KW et al. Attributable fraction of tobacco smoking on cancer using population-based nationwide cancer incidence and mortality data in Korea. BMC Cancer 2014; **14:** 406.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; **49:** 33-64, 31.

References

المراجع

Parlatescu Ioanina oS, Mihai Lelia. TREATMENT APPROACH OF ORAL LEUKOPLAKIA. REVIEW OF LITERATURE. 2013; **8:** 39-43.

Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. J Am Dent Assoc 2008; **139:** 896-905; quiz 993-894.

Pawaiya2 PKaR. Advances in Cancer Diagnostics. Brazilian Journal of Veterinary Pathology 2010; **3:** 142-153.

Penna A, Galluzzi L. The quantitative real-time PCR applications in the monitoring of marine harmful algal bloom (HAB) species. Environ Sci Pollut Res Int 2013; **20:** 6851-6862.

Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. Clin Chem 2011; **57:** 675-687.

Poh CF, Ng S, Berean KW, Williams PM, Rosin MP, Zhang L. Biopsy and histopathologic diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. J Can Dent Assoc 2008; **74:** 283-288.

Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Nat Rev Immunol 2014; **14:** 166-180.

Puneet Kumar RD, Prince Kumar, Harkanwal P. Singh, Suresh Yadav, Shallu Tyagi. Imperative role of early diagnosis in precancerous lesions: Oldideas, new findings,yet more questions Clinical Cancer Investigation Journal 2012; **1:** 184-189.

Punyani SR, Sathawane RS. Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. Clin Oral Investig 2013; **17:** 517-524.

Radpour R, Fan AX, Kohler C, Holzgreve W, Zhong XY. Current understanding of mitochondrial DNA in breast cancer. Breast J 2009; **15:** 505-509.

Raghu Radhakrishnan BSaDB. Oral Cancer – An Overview. In: Ogbureke DKUE, ed. Oral Cancer. InTech; (2012): 388 pages.

Ramasubramanian A, Ramani P, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A, Thiruvengadam C. Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-D1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. J Nat Sci Biol Med 2013; **4:** 349-358.

Ramnarayan Belur Krishna Prasad AS, Harsha Mysore Babu. An insight into salivary markers in oral cancer. Dental Research Journal 2013; **10:** 287-295.

Ranjith Raveendran SGN. Precipitants of oral cancer in India. Clinical Cancer Investigation Journal 2012; **1:** 111.

Ravi V BC, Gosselin BJ, Paydarfar JA, Addante RR, Black CC, and Pastel DA. Oral Cavity Cancer: A Review of Patterns of Spread. Neurographics 2011**:** 56-64.

Reddy SG, Kanala S, Chigurupati A, Kumar SR, Poosarla CS, Reddy BV. The sensitivity and specificity of computerized brush biopsy and scalpel biopsy in diagnosing oral premalignant lesions: A comparative study. J Oral Maxillofac Pathol 2012; **16:** 349-353.

Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia--a review. Oral Oncol 2005; **41:** 551-561.

RM Logan AG. Biopsy of the oral mucosa and use of histopathology services. Australian Dental Journal 2010; **55:** 9-13.

Roshni Roy NDS, Sandip Ghose, Ranjan R Paul, Anindita Ray, Indranil Mukhopadhyay, Roy aB. Association between risk of oral precancer and genetic

variations in microRNA and related processing genes. Journal of Biomedical Science 2014**:** 1-7.

s.mader s. essential of biology Inc., 1221 avenue of the americas New york ,NY 10020, McGraw-Hill, companies. (2007). 54-55- 56-61-160-164

S. Porterracewo.oral cancer. Cawsons essentials of oral pathology and oral medicine(seveth edition edn).(2002):243-254.

Sandra K. Al-Tarawneh MBB, Christopher F. Dibble, and Sompop Bencharit. Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review. OMICS A Journal of Integrative Biology 2011; **15:** 353-361.

Saravanan K, Kodanda Ram M, Ganesh R. Molecular biology of oral sub mucous fibrosis. J Cancer Res Ther 2013; **9:** 179-180.

Schwarz F, Maraki D, Yalcinkaya S, Bieling K, Bocking A, Becker J. Cytologic and DNA-cytometric follow-up of oral leukoplakia after CO2- and Er:YAG-laser assisted ablation: a pilot study. Lasers Surg Med 2005; **37:** 29-36.

Scully C, Bagan JV, Hopper C, Epstein JB. Oral cancer: current and future diagnostic techniques. Am J Dent 2008; **21:** 199-209.

Seijas-Naya F, Garcia-Carnicero T, Gandara-Vila P, Couso-Folgueiras E, Perez-Sayans M, Gandara-Vila R et al. Applications of OralCDx(R) methodology in the diagnosis of oral leukoplakia. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2012; **17:** e5-9.

Seoane Leston J, Diz Dios P. Diagnostic clinical aids in oral cancer. Oral Oncol 2010; **46:** 418-422.

Shah FD, Begum R, Vajaria BN, Patel KR, Patel JB, Shukla SN et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. Indian J Clin Biochem 2011; **26:** 326-334.

Shifeng lxshieng,zhenni ji, wei cheng and huijun yang. Correlation between increased copy number of mitochondrial DNA and clinicopathological stage in colorectal cancer. ONCOLOGY LETTERS 2011; **2:** 899-903.

Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of Plasmodium species with improved sensitivity for mixed infections. J Clin Microbiol 2009; **47:** 975-980.

Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. J Biomed Biotechnol 2010; **2010:** 737385.

Sperandio M, Brown AL, Lock C, Morgan PR, Coupland VH, Madden PB et al. Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. Cancer Prev Res (Phila) 2013; **6:** 822-831.

Sridharan G. Epidemiology, control and prevention of tobacco induced oral mucosal lesions in India. Indian J Cancer 2014; **51:** 80-85.

Stefano Petti a, Masood Mohdb, Crispian Scully Revisiting the association between alcohol drinking and oral cancer in nonsmoking and betel quid non-chewing individuals. Cancer Epidemiology 2012; **36:** 1-6.

Sumairi B. Ismail SKSKaRBZ. oral lichen planus and lichenoid reactions : etiopathogenesis, diagnosis, management, and malignant transformation oral science 2007; **49:** 89-106.

Taneja L NA, Vohra P. Arya V. Oral submucous Fibrosis: An oral physician approach. Journal of Innovative Dentistry 2011; **1:** 1-5.

References

Tapia JL, Goldberg LJ. The challenges of defining oral cancer: analysis of an ontological approach. Head Neck Pathol 2011; **5:** 376-384.

Tatarkova Z, Kuka S, Petras M, Racay P, Lehotsky J, Dobrota D et al. Why mitochondria are excellent targets for cancer therapy. Klin Onkol 2012; **25:** 421-426.

Tavares RG SR, Borges ALP , Rodrigues MT , Castelan LA , Vasconcelos J , Anschau ME , Spalding SM Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2011; **17:** 239-248.

Treister jMBns. oral cancer. clinical oral medicine and pathology. (2010): 113-128.Tshering Vogel DW, Zbaeren P, Thoeny HC. Cancer of the oral cavity and oropharynx. Cancer Imaging 2010; **10:** 62-72.

van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2009a; **14:** E310-314.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol 2009b; **45:** 317-323.

van Zyl A, Bunn BK. Clinical features of oral cancer. SADJ 2012; **67:** 566-569.

Vanaja Reddy PVW, Naveen Reddy Banda, Prashanti Reddy. Oral Submucous Fibrosis: Correlation of Clinical Grading to various habit factors. INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTAL CLINICS 2011; **3:** 21-24.

Verschoor ML, Ungard R, Harbottle A, Jakupciak JP, Parr RL, Singh G. Mitochondria and cancer: past, present, and future. Biomed Res Int 2013; **2013:** 612369.

Villa A, Villa C, Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. Aust Dent J 2011; **56:** 253-256.

Vinay Kumar M, MD, FRCPath, Abul K. Abbas, MBBS, Jon C. Aster, MD, PhD. ROBBINS BASIC PATHOLOGY Library of Congress Cataloging-in-Publication Data (2013).

Viviana P. Lutzky DJM, David Chin, William B. Coman, Peter G. Parsons, Boyle aGM. Biomarkers for Cancers of the Head and Neck. Clinical Medicine: Ear, Nose and Throat 2008:1 2008**:** 5-15.

Walsh G. Gene manipulation and recombinant DNA technology. Pharmaceutical Biotechnology. The Atrium, Southern Gate, Chichester,

West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons Ltd, ; (2007): 52.

Walter ABHJLRR. Essential cell biology (THIRD EDITION edn), taylor and francis group ,llc, an informa business, 270 madison aveue ,new york ,NY10016, USA, and 2 park Square, Milton park, Abingdon,OX144RN,UK, Garland science (2009).

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. Nat Rev Cancer 2005; **5:** 591-602.

WFP van Heerden AvZ, Supplement. The role of the dentist in the early detectionof oral cancer. 2011; **66:** 1-4.

Wood NH, Khammissa R, Meyerov R, Lemmer J, Feller L. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. Eur J Dent 2011; **5:** 101-106.

Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2010; **46:** 226-231.

References

المراجع

Xu E, Sun W, Gu J, Chow WH, Ajani JA, Wu X. Association of mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes with risk of esophageal adenocarcinoma. Carcinogenesis 2013; **34:** 2521-2524.

Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. Life Sci 2011; **89:** 65-71.

Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrri A, Kouvaris J, Kelekis N et al. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. Head Neck Oncol 2011; **3:** 2.