مجلة جامعة دمشق للعلوم الطبية المجلد: (40) العدد: 1 (2024) الصفحات: (163-176)

تقييم عدد نسخ الدنا المتقدري وخطر التدخين للإصابة بسرطان شائك الخلايا في الحنجرة لدى سكان مدينة دمشق

لنا سيال[1]، د. عمر حمادة[2]، د. عروب المصري[3]

[1] طالبة دكتوراه – قسم طب الفم – كلية طب الأسنان – جامعة دمشق.
[2] أستاذ مساعد – قسم طب الفم – كلية طب الأسنان – جامعة دمشق.
[3] باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

الملخص:

يعدّ سرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق أكثر أنواع السرطانات شيوعًا في جميع أنحاء العالم. وفي سوريا، تزداد نسب الإصابة بين الأشخاص المدخّنين. في هذه الدراسة تم اختبار العلاقة بين التدخين وسرطان شائك الخلايا في الحنجرة من خلال تقدير عدد نسخ الدنا المتقدري الحر في لعاب المرضى.

تناول البحث جمع اللعاب من 201 عينة؛ منها 64 حالة سرطان شائك الخلايا في الحنجرة و137 حالة شاهد بموافقة كتابية مستنيرة. تم عزل الدنا الحر من جميع العينات وإجراء التفاعل التسلسلي للبوليميراز في الوقت الحقيقي لمعايرة عدد نسخ الدنا المتقدري لكلا مجموعتين العينة بعد بالفحص السريري والنسيجي للآفة. تم استخدام اختبار مان وتيني و كانت مستويات الدنا المتقدري الحر عند المدخنين أعلى بكثير من المجموعة الشاهد. كانت جميع الاختبارات ذات دلالة إحصائية . $P<0.05$كما تم إجراء تحليل منحنى(ROC) ، وكانت نقطة القطع المثلى عند (cutoff 3.857.827) لحساب حساسية 0.422 ونوعية 0.832، $p<0.001$ لتشخيص المرضى المدخنين الذين يعانون من سرطان شائك الخلايا في الحنجرة .

أشارت النتائج إلى أن محتوى اللعاب من الدنا المتقدري الحر يرتبط ارتباطًا وثيقًا بحالة التدخين، الأمر الذي يمكن أن يجعل منه مؤشراً واعداً يتمتع بالخصائص الرئيسية للمؤشرات الحيوية التشخيصية، والبضع في الحد الأدنى والنوعية العالية، والحساسية.

الكلمات المفتاحية: سرطان شائك الخلايا في الحنجرة، التفاعل السلسلي للبوليميراز في الوقت الحقيقي، اختلاف عدد النسخ، الدنا المتقدري الحر، خزعة اللعاب، غير باضع، اختبار منحنى ROC.

Submitted: 9/2/2022 Accepted:14/4/2022

Copyright: Damascus University Syria.
The authors retain copyright under CC BY-NC-SA

ISSN: 2789-7214 (online)
http://journal.damascusuniversity.edu.sy

Evalution mitochondrial DNA copy number and smoking risk of larynx squamous cell carcinoma in Syrian population

Lana sayal[1], Dr. Omar Hamadah[2], Dr. AroubAlmasri[3]

[1] PHD student - Department of oral medicine - faculty of dentistry- Damascus University.
[2] Professor - Department of oral medicine - faculty of dentistry- Damascus University.
[3] Researcher at National Commission for Biotechnology.

Abstract:

Head and neck squamous cell carcinoma is the most commonly diagnosed cancer worldwide. The smoking habits, manifest the Syrian population toward higher susceptibility to develop head and neck squamous cell carcinoma. Here, we have investigated the association of smoking with copy number variation of cell-free mitochondrial DNA in cases and controls groiups. Cell-free DNA from saliva was isolated from 64 larynx squamous cell carcinoma cases and 137 controls with informed written consent using QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit. Real-time polymerase chain reaction was done for copy number variation in cell-free mitochondrial DNA. to evaluate the diagnostic application between the two study groups using clinicopathological parameters. Mann-Whitney U used to measure the levels of cell-free mitochondrial DNA of cases in association with smoke was significantly higher ($p < 0.05$) than controls. Using receiver operating characteristic curve (ROC) analysis between larynx squamous cell carcinoma cases and controls, we distinguished cell-free mitochondrial DNA (cutoff: 3.857.827; sensitivity: 0.422; specificity: 0.832; $p < 0.001$)

Our result indicates that the cell-free mitochondrial DNA content is highly associated with smoking which shows greater promises, holding the key characteristics of diagnostic biomarkers, that is, minimal invasiveness, high specificity, and sensitivity.

Keywords: Larynx Squamous Cell Carcinoma, Real Time PCR, Copy Number Variation, Cell-Free Mitochondrial DNA, Saliva Biopsy, Non-Invasive, Receiver Operating Characteristic

المقدمة:

يُعد سرطان الرأس والعنق من أكثر أنواع السرطانات شيوعًا.، حيث احتلّت سرطانات الرأس والعنق (HNSCC) المرتبة السادسة– السابعة بين أكثر أنواع السرطانات شيوعًا على مستوى العالم في عام 2018 (890.000 حالة جديدة و450.000 حالة وفاة) (Vučičević Boras Chow, 2020 ; *et al.*, 2019) (Kabalan *et al.*, 2021). تتميز القارة الآسيوية بمعدلات حدوث لسرطان الحفرة الفموية والبلعوم ومعدلات وفاة هي الأعلى بين القارات الأخرى (Bugshan & Farooq, 2020). تُعدّ سرطانات الرأس والعنق أوراماً خبيثة تظهر في كلٍّ من تجويف الحفرة الفموية والبلعوم والحنجرة، بمعدل اصابة 300000 سرطان تجويف الحفرة الفموية، و142000 سرطان البلعوم، و156000 سرطان الحنجرة. بلغ معدل الإصابة المعيارية بالنسبة للعمر 12.7 و 3.7 لكل 100000 من الذكور والإناث، على التوالي (Lee *et al.*, *2019*)، وظهرت زيادة مقلقة في حالات سرطانات الرأس والعنق عند الأشخاص الأصغر سنًا خاصة في الشرق الأوسط بما يعادل (14.5٪) وأفريقيا(Alqahtani *et al.*, 2020).

في لبنان، يُقدّر خطر الإصابة قبل سن 75 بنحو 17.5٪، ويتم تشخيص 7100 حالة جديدة من السرطان كل عام (Kabalan *et al.*, 2021). (Giudice, Liborio, Averta, Barone, & Fortunato, 2019). أما في سوريا، تم رصد 452 حالة لسرطان الرأس والعنق بين عامي 2010 – 2017، بمتوسط عمر 37.3 بانحراف معياري يقدر ب 22.8 ± SD عام)، تموضع فيها المرض أكثر ما يكون في الحنجرة، بينما كان سرطان شائك الخلايا SCC هو النمط الأكثر انتشاراً (Serindere, Bolgul, Gursoy, Hakverdi, & Savas, 2019)، بنسبة بلغت 90 – 95% من الحالات (Bugshan & Farooq, 2020 ; Serindere *et al.*, 2019) (Kumar *et al.*, 2017). وعلى غرار أنواع السرطان الأخرى، يلعب الاستعداد الوراثي وتعدد الأشكال الجينية دورًا مهمًا في مسببات HNC . (Vučičević Boras *et al.*, 2019)

تُعدّ المتقدرات عُضيّة ديناميكية معقّدة توجد في سيتوبلازم الخلايا حقيقية النواة (Wu *et al.*, 2019)، ويتباين محتوى الخلايا من الدنا المتقدري mtDNA بما يتناسب ومتطلبات الخلية من الطاقة للحفاظ على وظائفها الفسيولوجية الطبيعية، حتى أنه يختلف كذلك بين شخص وآخر من 1000 إلى 10000 نسخة لكل خلية،(Mondal *et al.*, 2013). إن الدنا المتقدري عبارة عن جزيء DNA حلقي مزدوج السلسلة يبلغ حجمه 16.6 ألفاً من الأزواج القاعدية، ويشفِّر 24 مورثة مسؤولة عن تخليق البروتين (22 tRNAs و 2 rRNAs و13 عديد الببتيد المسؤول عن السلسلة التنفسية. يتميز الدنا المتقدري عن الدنا النووي بقلة الإنترونات والهستونات الواقية وكذلك محدودية آليات الإصلاح، مما يجعله أكثر عرضة للتلف من قبل الجذور الحرة النشطة (ROS) والعوامل الضارة الأخرى. بالإضافة إلى ذلك، قد يؤدي حدوث الطفرات في الدنا المتقدري mtDNA أو الاختلال في عدد نسخه إلى انخفاض نشاط معقد الإنزيم التنفسي أو تلف السلسلة التنفسية وتقليل كفاءة التمثيل الغذائي للطاقة، الأمر الذي يؤدي إلى حدوث تطور للأورام السرطانية أو الاعتلالات العصبية وغيرها من الأمراض.(Wang *et al.*, 2018) وهنا يجدر الإشارة إلى أن العوامل المسرطنة وكذلك المستويات المرتفعة من الجذور الحرة النشطة الناتجة عن تغيرات البيئة الداخلية للأنسجة السرطانية، يمكن أن تتسبب بدورها في حدوث طفرات تؤدي في النهاية إلى تغييرات في مستويات نسخ وتضاعف الدنا المتقدري mtDNA (Duan *et al.*, 2020).

تلعب المتقدرات في الخلية دورًا مهمًا في الاستقلاب وإنتاج الجذور الحرة والموت الخلوي المبرمج، حيث تعكس الشدة التأكسدية حالة من عدم التوازن الفسيولوجي بين إنتاج الجذور الحرة التفاعلية (ROS) وآلية الدفاع المضادة للأكسدة ضمن

النظام الحيوي للجسم لإصلاح الضرر الناتج عن هذه الجذور. وتساهم زيادة الشدة التأكسدية في إحداث تغيير ضمن الدنا المتقدري mtDNA أو في عدد نسخ هذا الدنا داخل الخلايا البشرية؛ قد تعمل الجذور الحرة النشطة على تغيير التعبير عن مورثات نووية معينة وتحفيز عدة استجابات لمواكبة الشدة التأكسدية ودعم عملية التمثيل الغذائي بهدف إنقاذ الخلية، حتى إذا تجاوزت هذه الجذور في إنتاجها حداً معيناً سببت ضررًا تأكسديًا لـ mtDNA. في المقابل، ثبت أن مضادات الأكسدة تقلل من تلف المتقدرات وتزيد من التكوُّن الحيوي لها وعدد نسخ الدنا المتقدري mtDNA. لذلك، قد يعمل تقدير عدد نسخ الدنا المتقدري كمؤشر حيوي واعد للمشاكل الصحية المرتبطة بالشدة التأكسدية.(Wu *et al.*, 2019)

تكمن عوامل الخطر الرئيسة لسرطان شائك الخلايا SCC في الرأس والعنق بالتدخين وشرب الكحول.(Kabalan *et al.*, 2021; Vučičević Boras *et al.*, 2019) حيث يُعد التدخين العامل الأكثر خطورة، فهو يتسبب في وفاة حوالي 6 ملايين شخص سنوياً في جميع أنحاء العالم، فهو مصدر لمواد مسرطنة هي من مكونات نبات التبغ نفسه، بما في ذلك النيتروسامين، N- نيتروسونورنيكوتين، 4- (ميثيل نيتروسامينو) -1- (3-بيريديل) -1-بوتانون)، والتي يتكون معظمها عند حرق التبغ (مثل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات [PAHs]، وتحديداً البنزو [أ] البيرين.(Kabalan *et al.*, 2021; Lewandowska, Rudzki, Rudzki, Lewandowski, & Laskowska, 2019)

يحتوي دخان السجائر على أكثر من 4800 مادة كيميائية؛، 69 منها على الأقل مرتبطة بالسرطان،(Ibrahim, Al-Humaish, & Al-Obaide, 2018) وفقًا للوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC)، 16 مادة منها تم تصنيفها على أنها مسببة للسرطان عند الإنسان، ولا سيما المواد الأقوى فعالية في إحداثه: البنزين، ثنائي ميثيل نيتروسامين، إيثيل ميثيل نيتروسامين، داي إيثيل نيتروسامين، نيتروسوبيروليدين، هيدرازين وكلوريد فينيل.(Lewandowska *et al.*, 2019) السجائر هي أكثر أشكال التدخين ضررًا، تظهر الأبحاث التي أجرتها جمعية السرطان الأمريكية أن تدخين التبغ له علاقة سببية بما لا يقل عن 16 نوعًا من السرطان. صنفت الوكالة الدولية لبحوث السرطان التدخين على أنه سبب لأورام الدم والحنجرة، شكل رقم (1)، وسرطان شائك الخلايا في الفم والتهاب الشعب التنفسية والمريء والبنكرياس والكلى والمثانة وسرطان الرئة والأمعاء الغليظة وتجويف الأنف والجيوب الأنفية والمعدة والبنكرياس، وسرطان الكبد والمثانة وعنق الرحم. (Ibrahim *et al.*, 2018; Lewandowska *et al.*, 2019; Shingala).

الشكل رقم(1): استئصال ورم حنجرة (سرطان شائك الخلايا)

يضاف إلى ذلك دوره في أمراض القلب والأوعية الدموية والسكري، حتى يمكن اعتباره مميتًا. يُعزى انتشار التدخين على

نطاق واسع إلى حد ما إلى تنوع أشكاله؛ مثل السجائر العادية الإلكترونية والسيجار والشيشة- تسبب السيجارة استنشاق 500-600 مل فقط من الدخان المنبعث من حرق واحدة منها، إلا أن جلسة الشيشة الواحدة هي استنشاق لحوالي 90.000 مل من الدخان؛ مما يجعل الشيشة الأكثر بـ4 مرات في التعرض لأول أكسيد الكربون والأكبر بـ56 مرة في حجم الدخان المستنشق مقارنة مع السيجارة.(López-Ozuna *et al.*, 2020)، وهنا لا بُدّ من الإشارة إلى أن المدخّن السلبي يستنشق ثلاثة أضعاف ما يستنشقه المدخن نفسه من ثاني أكسيد الكربون، وأكثر 10 مرات من النيتروسامين، وأكثر بـ 15 مرة بنزين، وما يصل إلى 70 ضعفًا من الأمونيا. إذ يزيد التدخين السلبي من خطر الإصابة بسرطان الرئة بمقدار الربع، ويزيد من خطر الإصابة بسرطان الحنجرة والمريء وكذلك سرطان الدم في مرحلة الطفولة والفم والدماغ والمثانة والشرج والمعدة (تقرير جمعية السرطان الأمريكية).(Lewandowska *et al.*, 2019)

فالتعرض طويل الأمد لهذه المواد يؤدي إلى إحداث تلف في الحمض النووي، والتعرض للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات بشكل خاص يمكن أن يولد أيضًا أنواعًا مستدامة من الجذور الحرة النشطة (ROS)، تستهدف الحمض النووي للمتقدرات (mtDNA) بشكل أساسي، وبالتالي اختلال وظيفي في المتقدرات. (Duan *et al.*, 2020)

يُعزى سرطان الرأس والعنق إلى كل من التدخين وشرب الكحول معًا في حوالي 51٪ من الحالات في الولايات المتحدة، و84٪ منها في أوروبا، و83٪ في أمريكا اللاتينية.(Lee *et al.*, 2019) أما في الدول العربية، تم حصر معدلات انتشار سرطان الفم في نطاق 1.8 إلى 2.13 من كل 100000 فرد، في ظروف التدخين وشرب الكحول، كما أن التعرض لأشعة الشمس والإصابة بفيروس الورم الحليمي البشري HPV من عوامل الخطر المحتملة (Alqahtani *et al.*, 2020)

من الناحية التشخيصية، اكتسبت الخزعة السائلة liquid biopsy (LB) وما فيها من حمض نووي سواء ضمن الخلايا المشتقة من الورم(ctDNA)circulating tumor DNA أو حراً تطلقه خلايا الورم cell free DNA (cfDNA) اهتمامًا كبيرًا كطريقة لتفادي قيود الخزعة النسيجية، إذ تمتلك جزيئات ctDNAs العديد من الخصائص الجزيئية المرتبطة بالورم التي يمكن أن تحقق النوعية عند الكشف عن هذا الورم، مثل الطفرات وتغيرات المثيلة، وحاليًا أُوصي باستخدامها سريرياً في حال كان الحصول على عينة من أنسجة الورم مُتعذّراً أو ليس بالحد الكافي.

كذلك تعمل الخزعة السائلة أيضًا كمكمِّل للتنميط الجيني الروتيني للأنسجة في تحديد آليات المقاومة المكتسبة (على سبيل المثال ، طفرة EGFR T790M)(Li *et al.*, 2020). قد تقدّم فكرة تحليل "الخزعة السائلة" باستخدام التضخيم السلسلي في الزمن الحقيقي وسيلة غير باضعة للمراقبة (Kumar *et al.*, 2017)، حيث تم الكشف عن تغيرات في عدد نسخ الدنا المتقدري الحر في سوائل الجسم المختلفة، مثل خلايا الدم الحرة والبلازما واللعاب والحيوانات المنوية، والبول، والسائل النخاعي، وكذلك في عينات نسيجية، مثل أنسجة الورم، والأعضاء المختلفة.(Kumar *et al.*, 2017)

الهدف من البحث:

تم افتراض الدراسة لاختبار التدخين كعامل خطورة على محتوى cfmtDNA وإمكانية استخدامها كعلامة تشخيصية مبكرة في لعاب مرضى سرطانات شائك الخلايا في الحنجرة بالمقارنة مع عينات شاهد غير مدخنين.

مواد البحث وطرائقه:

اختيار العينة:

أجريت الدراسة حالة- شاهد المستندة إلى كلية طب الأسنان- جامعة دمشق، بين عامي 2019 و2021، شملت هذه الدراسة 64 حالة من مرضى سرطان شائك الخلايا في الحنجرة LSCC

و137 من حالات الشاهد، وتم جمع العينات من مشافي دمشق (المواساة) حيث أجريت الدراسة في مختبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

تم اختيار حالات (HNSCC) ممن يعانون سرطان شائك الخلايا في الحنجرة (LSCC) وفق المعايير التالية: (1) حداثة تشخيص المرض؛ أي عدم الخضوع مسبقاً لعلاج جراحي أو كيميائي أو إشعاعي، (2) شمول الذكور والإناث معاً دون تحيّز، (3) العمر 18 عامًا أو أكثر. تضمنت المواقع الفرعية لـ HNC الحنجرة.

وبالمقابل، تضمنت معايير الاستبعاد (1) حالات الالتهاب الحاد في تجويف الحفرة الفموية مثل التواج، وخرّاج الأسنان، ورضّ الأنسجة الفموية، (2) حالات السكتة الدماغية أو الإنتان أو الزرع، (3) حالات الأمراض الجهازية التي تنتج الحمض النووي المطلق من الخلايا مثل احتشاء عضلة القلب الحاد، والتهاب البنكرياس الحاد والسكري واضطرابات المناعة الذاتية، (4) حالات خاضعة لعلاج كيميائي أو إشعاعي، (5) حالات خاضعة لعلاج طبي يسبب نقص السكر أو يتدخل في مكونات اللعاب مثل مضادات ارتفاع ضغط الدم ومضادات الهيستامين ومضادات الكولين وحاصرات بيتا الأدرينالية.

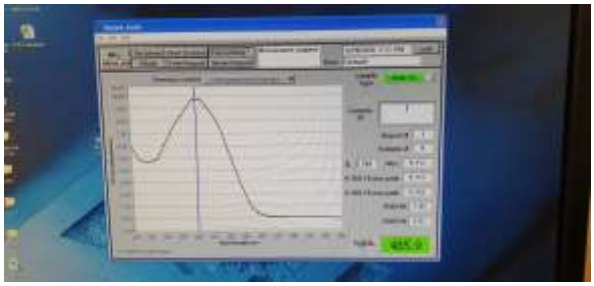
جرى تنظيم استبيان من 42 سؤالًا شملت معلومات عن الخصائص السريرية والديموغرافية للحالة المدروسة؛ العمر والجنس والعرق والدخل والتاريخ المهني والتاريخ الطبي (وجود أمراض رئوية أو قلبية)، والتاريخ السكني ونوعية الحياة (الحالات المرضية فقط)، والتاريخ العائلي للسرطان، ومعلومات أكثر تفصيلاً عن تاريخ التدخين وشرب الكحول تضمنت وضع التدخين الحالي (أبدًا، سابق، حالي)، ومدة التدخين، وعدد السجائر في اليوم وتاريخ شرب الكحول. وقد تم جمع هذه البيانات أثناء المقابلات الشخصية مع الباحث، حيث تم أخذ موافقة خطية مستنيرة للمشاركة من جميع المشاركين في الدراسة، وتم الحصول على الموافقة الأخلاقية المؤسسية لبحوث الإنسان في دمشق. ويجدر القول أن نتائج التشريح المرضي النهائي أدت إلى استبعاد 10 حالات بسبب نوعية السرطان غير المؤهلة(كسرطان الخلايا القاعدية والغدية)، ليتم تضمين 64 حالة من سرطان شائك الخلايا (HNSCC) في التحليلات النهائية.

الشكل رقم(2): يوضح خطوات ومواد عزل الدنا

جُمعت عينات اللعاب غير المحفَّزة من جميع الأشخاص على النحو التالي: امتناع المشارك عن الشرب والأكل سوى مضغ العلكة والنعناع لمدة ساعتين قبل أخذ العينات. بعد ذلك، تم غسل فم المشارك بالماء المعقم مرتين لمدة 15 ثانية مع 25 مل من 0.9٪ كلوريد الصوديوم المعقم. ليتم بعدها جمع اللعاب المفرز مباشرة من القناة اللعابية بحجم 1مل. تم تثفيل اللعاب بقوة 1600 دورة في الدقيقة (rpm) عند درجة حرارة 4 مْ، يليه إعادة التثفيل لـ 500 ميكرولتر من الطافي عند 16000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق. تم عزل الحمض النووي الحر والمطلق من الخلايا (cfDNA) من طاف 200 ميكرولتر باستخدام عتيدة

DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

وفقًا لتعليمات الشركة الصانعة باستثناء فترة التحضين التي تم تمديدها حتى ساعة واحدة عند 60 درجة مئوية. تم الاحتفاظ بمستخلصات الحمض النووي الحر النهائية بحجم 50 ميكرولتر عند درجة حرارة −80 درجة مئوية حتى وقت إجراء التحليل. تم قياس الدنا عن طريق جهاز Nanodrope



الشكل(3): يوضح قياس تركيز الدنا بجهاز Nanodrope

تم ترحيل العينات للتأكد من دقة العصابة الناتجة

الشكل رقم(4): يوضح جهاز الترحيل للتأكد من دقة العصابة الناتجة

الشكل(5): يوضح حوض وجل الرحلان بعد حقن العينات

الشكل (6): صورة توضح دقة العصابة الناتجة

تم استخدام جهاز التدوير الحراري SmartCycler® System (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA) لإجراء تضخيم PCR في الوقت الحقيقي لـ Human mitochondrial genome NC_012920 وهو جين متقدري، وتم الحصول على البادئات والمسابر من شركة (VbC Biotech,Vienna)، الجدول رقم (1).

الجدول رقم(1): تتابع المرئسات والمسبر المستخدمة في البحث

Gene accession N.	Primer/probe	Oligonucleotide sequence	Product size
Human mitochondrial genome NC_012920	Pri-hmito F5 hmMito R5 PRO-hmito P5	5' CTTCTGGCCACAGCACTTAAAC 3' 5'GCTGGTGTTAGGGTTCTTTGTTTT 3' FAM-ATCTCTGCCAAACCCC	65 bp

تم تحضير التفاعل بحجم 25 ميكرولتر (12.5 ميكرولتر من Luna® Universal Probe qPCR Master Mix (BioLabs Inc. Cambridge, MA, USA)، 0.45 ميكرومولار من البادئات لكل منهما، و0.25 ميكرومولار من المسبار و2.5 ميكرولتر من مستخلص الدنا). تم إجراء التفاعل باستخدام نظام (SmartCycler® (Cepheid Inc. CA ، Sunnyvale، ، الولايات المتحدة الأمريكية) وفق البرنامج التالي: 95 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة، تليها 60 دورة من مرحلة التمسخ عند 95 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، والتلدين عند 55 درجة مئوية لمدة 15 ثانية، والاستطالة عند 60 درجة مئوية لمدة 15 ثانية. تم إنشاء المنحنيات القياسية باستخدام سلسلة العياري واستخدامها في القياس الكمي المطلق للدنا المتقدري الحر المطلق بين مجموعتي المرضى والشاهد.

التحليل الإحصائي:

تم التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج SPSS الإصدار 25، حيث تم تطبيق اختبار Mann-Whitney U و Pearson chi-square. كما تم إجراء تحليل منحنى (ROC)، وتم قياس المناطق الواقعة تحت منحنيات AUCs لتقدير نوعية وحساسية عدد نسخ الدنا المتقدري cfmtDNA لتشخيص مدى تأثير عامل الخطورة التدخين لدى المرضى الذين يعانون من HNSCC مقارنة بين حالات الشاهد

الجدول رقم(2): الإحصاءات الوصفية للعينات: عدد المرضى سرطان الحنجرة 64 بينما حالات الشاهد 137

	حالات المرضى 64(%31.8)	حالات الشاهد 137 (%68.2)
المتوسط (عدد نسخ) الوسيط الانحراف المعياري	58747864.43 1667872.642 37925225.98	8877180.998 987084.2920 5055785.610
مدخنين الوسيط المدى	52 (%25.9) 1.0000 00.	13 (%6.5) 1.0000 00.
غير مدخنين الوسيط المدى	12 (%6.0) 0000. 00.	124 (%61.7) 0000. 00.

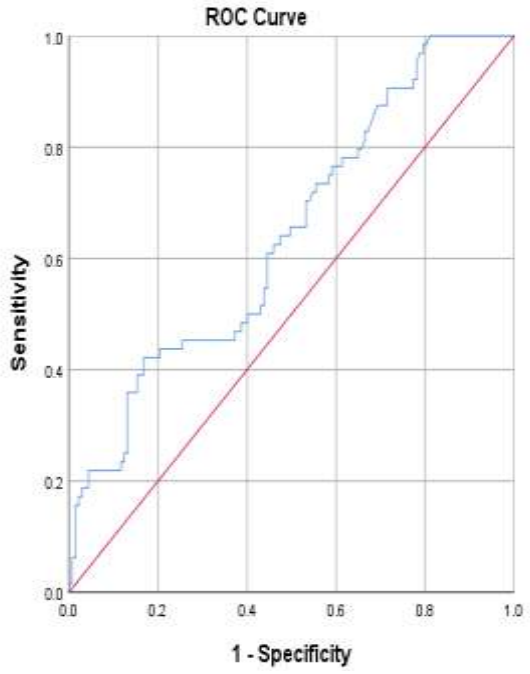
النتائج:

تـم اختبـار التوزيـع الطبيعـي بواسـطة Kolmogorov-sminrnov حيـث وجـدث p <0.00 اقـل مـن 0.05 بالتـالي التوزيـع غيـر طبيعـي ممـا يتوجـب علينـا اسـتخدام اختبـار مـان ويتنـي اللامعلمـي. قارنـا مسـتويات cfmtDNA فـي اللعـاب، بواسطة سلسلة التفاعل PCR في الوقت الحقيقي، بين حـالات LSCC 64(25.9%) 52 مـــدخنين و12 (6.0%) غيـــر مـدخنين وعناصـر الشـاهد 137 (6.5%) 13 مـدخنين و124 (61.7%) غيـر مـدخنين. وقـد لوحظـت فـروق ذات دلالـة إحصائية في تدخين السجائر (p <0.01) المرتبطة ب LSCC بالمقارنة مع الشواهد الصحية كعوامل خطر مساهمة لانتشار LSCC فـي دمشـق. حيـث تـم العثـور علـى زيـادة كبيـرة فـي مستوى عدد نسخ cfmtDNA في حالات LSCC بالمقارنة مع مجموعـــة الشـــاهد الصـــحية (1667872.642) مقابـــل 987084.2920؛ مان ويتني: p <0.001) جدول (2). تظهر لنـا p value أقل من 0.05 بالتالي توجد فروق ذات دلالة احصائية بين مجموعة مرضى السرطان المدخنين وبين حالات الشـاهد غيـر المـدخنين لصـالح مجموعـة المـدخنين. كمـا تـم اسـتخدام اختبـار كـاي Pearson's chi-square test لتقيـيم الاختلافـات بـين الحـالات المرضـية والشـاهد وعوامـل الخطـر (تـدخين التبـغ). لـوحظ ارتفـاع مسـتوى cfmtDNA فـي حـالات LSCC عند مقارنتها بعناصر الشاهد. للتمييز بين المجموعتين، تم اجراء اختبار ROC تمت الإشارة إلى نقطة القطع المثلى عند 3.857.827 لـــ cfmtDNA بحساســية 0.422، خصوصــية 0.832 (p <0.001؛ 95٪). كانت جميع الاختبارات ذات دلالة إحصائية حيث اعتبرت P <0.05 شكل (2).

الجدول رقم (3): وسيط عدد نسخ الدنا المتقدري وقيمة الدالة p باستخدام اختبار مان وتيني لكلا المجموعتين

المجموعة	عدد المرضى	وسيط عدد نسخ الدنا المتقدري	P value
سرطان الحنجرة	64	1667872.642	p <0.001 **مان ويتني**
حالات الشاهد	137	987084.2920	p <0.000 **اختبار كاي**

الشكل رقم (2): مقارنة منحنى ROC في تشخيص المرضى LSCC المدخنين مقابل حالات الشاهد باستخدام عدد نسخ الدنا المتقدري cfmtDNA



المناقشة:

يُسهم تدخين السجائر في تطور سرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق، حيث يحوي التبغ على 3- (ميثيل نيتروسامينو) بروبيونيتريل (MNPN)، والنيتروزامين، والنيكوتين، التي تبدأ في إنتاج أنواع من الجذور الحرة النشطة. مما يؤدي إلى تخريب الدنا والرنا وبالتالي تشكل عوامل الخطر الرئيسة المسببة لتطور HNSCC، الناجم عن التهيج من الاتصال المباشر مع الأغشية المخاطية للفم وتلف الحمض النووي والخلايا الليفية، وبالتالي زيادة خطر الإصابة بمقدار 50 ضعفًا (Mondal *et al.*, 2013; Niaz *et al.*, 2017; Lewandowska *et al.*, 2019)، يُنظر إلى الزيادة في عدد نسخ المتقدرات على أنها تأثير تعويضي محتمل للانخفاض العام في وظيفة الجهاز التنفسي للمتقدرات بسبب الضرر الناتج عن الشدة التأكسدية.(Kumar *et al.*, 2017)

يسمح نقص الهستونات والبروتينات الأخرى التي تحمي الدنا المتقدري ومحدودية أنظمة إصلاح الدنا المتقدري بالمقارنة من تلك التي لوحظت في nDNA بزيادة التدهور في mtDNA كسبب محتمل لتوليد ROS والحث على موت الخلية المبرمج وبالتالي لزيادة ملحوظة في عدد النسخ كعملية تعويضية كما تترافق بزيادة ملحوظة بعدد الطفرات (Zhou *et al.*, 2014). يعد المحتوى العالي من mtDNA أيضًا علامة مهمة على ضعف آلية الايض الهوائية والتي يُعتقد أنها تشارك في آليات التسرطن(Malik & Czajka, 2013; Tan & Norhaizan, 2021). يُعتقد أيضًا أن المنتجات المرتبطة بالتبغ تسرع من تراكم الطفرات الجسدية في mtDNA مما يتسبب في حدوث عيوب في سلسلة نقل الإلكترون والفسفرة التأكسدية، والتي بدورها تؤدي إلى زيادة إنتاج الجذور الحرة ROS متبوعًا بالتسرب اللاحق إلى السيتوبلازم. نظرًا لوجود الدنا المتقدري بالقرب من مصدر إنتاج الجذور الحرة التفاعلية، يمكن أن يتلف الدنا المتقدري مما يؤدي إلى تراكم حدوث الحذف والطفرات (Malik & Czajka, 2013)، للتعويض عن هذا الضرر، تزيد المتقدرات من عدد نسخ الدنا المتقدري الخاص بها استجابةً للعوامل التي تتحكم بعملية نسخ وتضاعف mtDNA ومعالجة mtRNA والتي تشفر بواسطة الدنا النووي nuclear DNA يمكن لهذه العملية أن توضح الزيادة في عدد نسخ cfmtDNA وخطر الإصابة ب HNSCC، (Wu *et al.*, 2019)

في هذه الدراسة، وجدنا أن عدد نسخ cfmtDNA الأعلى بسبب عامل خطر مهم ($p < 0.0001$) مرتبط بتدخين السجائر، توافقت دراستنا مع دراسة Kumar, M., وزملائه من حيث الفروقات الجوهرية بين عينات المرضى المدخنين والشاهد رغم الاختلاف بنوعية العينة، حيث كانت العينة مصل (Kumar *et al.*, 2017) بينما الدراسة الحالية عينة لعاب مما يعطي موثوقية عالية بفعالية اللعاب كواسم حيوي غير باضع لسرطان شائك الخلايا وعلى الرغم من العديد من مزايا واسم اللعاب، إلا أن هناك قيودًا عليه؛ فتركيز معظم المواد التحليلية في اللعاب أقل بكثير (100-1000 ضعف) مقارنة بتركيزها النسبي في الدم. إلا أنه في حالات سرطان الفم، قد لا يكون هذا قيدًا خطيرًا لأن غالبية التحليلات يتم إطلاقها محليًا من موقع الورم (Panta & Wong, 2019). يعتبر اللعاب غير باضع وأقل نقلاً للعدوى (خالي من المخاطر)، كما أنه سهل الحفظ أيضًا لأنه لا يظهر أي قدرة على التخثر، مما يلبي المتطلبات السريرية كوسيط تشخيصي مثالي، يحتوي اللعاب على ثروة من المركبات الكيميائية (أي المعلومات)، ويمكن أن يعكس التغيير في تركيزها حالة المرض المحلية والجهازية. اللعاب مفيد بشكل خاص لأمراض الفم مثل الاضطرابات المحتملة الخباثة OPMDs وسرطان الفم، لأنها تشترك في الاتصال المباشر مع هذه الآفات، بالتالي يعكس بيئتها الجزيئية الداخلية بشكل أكثر دقة من سوائل الجسم البعيدة مثل الدم. يمكن أيضًا جمع عينات اللعاب من المرضى ذوي الاحتياجات الخاصة أو الإعاقات، أو الأشخاص القلقين، أو الأطفال الذين

يشكلون تحديًا لأخذ عينات الدم، أو في المرضى الذين يعانون من أمراض معدية شديدة الخطورة. كما أن فرص انتقال الأمراض المعدية عالية الخطورة مثل فيروس نقص المناعة المكتسب البشري منخفضة مع عينات اللعاب، تحدث التغييرات في محتوى الدنا المتقدري في سرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق، بغض النظر عن العمر وعادات التدخين، ويمكن اكتشافه في اللعاب، تشمل التغيرات الرئيسية في جينوم المتقدرات حدوث الطفرات وتغييرات في عدد النسخ للدنا المتقدري(Jiang *et al.*, 2005)(Panta & Wong, 2019) ;. تعتبر منطقة (D-loop) النقطة الساخنة للطفرات في الدنا المتقدري وبالتالي يعطي واسم حيوي قوي، يحتمل أن يؤدي وجود طفرات D-loop إلى تغيير السلسلة التنفسية والطاقة الحيوية. فطفرات الدنا المتقدري (mt-DNA) أكثر وفرة بمقدار 19–220 مرة من طفرات الحمض النووي p53 ويمكن الوصول إليه بسهولة من السوائل الجسدية مثل اللعاب (Fliss *et al.*, 2000)(Panta & Wong, 2019 ;

كما تميزت دراستنا عن الدراسة المذكورة أعلاه بعدد العينات الذي بلغ 100 فقط؛ 50 مرضي و50 شاهد بمتوسط عمر (54 و52 على التوالي) (Kumar *et al.*, 2017)

اختلفت نتائجنا مع الدراسات السابقة التي لوحظت زيادة خطر HNSCC لمدة> 25 عامًا من تدخين التبغ و> 20 عامًا من شرب الكحول معاً. ولكن يبدو أن التبغ بمفرده مادة مسرطنة ضعيفة نسبيًا في مجتمع الدراسة المذكورة. حيث وجد أن هناك ارتباط ضعيف للتدخين (الحالة والمدة والشدة) وسرطان شائك الخلايا للمريء في الآسيويين مقارنة بالأوروبيين. قد يكون هذا الاختلاف بسبب الاختلافات في أنماط التدخين (على سبيل المثال، الاستنشاق)، الخصائص الكيميائية للتبغ ، و / أو العوامل الوراثية (Lee *et al.*, 2019)

توافقت دراستنا مع دراسة Jiang, W.-W., وزملائه حيث وجد ارتفاع عدد نسخ الدنا المتقدري في منطقة Cox2, Cox1 في المتقدرات بين المدخنين مقارنة بغير المدخنين في عينات من غسول فموي يحوي لعاب، ولكن اختلفت دراستنا عن هذه الدراسة حيث كانت عينات اللعاب لدراستنا عينات لعابية غير مخففة، كما تمركز محور دراستنا عن الدنا الحر المطلق من الخلايا بينما بالدراسة المذكورة أعلاه تم استخراج الدنا من خلايا حرة مطلقة من الورم. تفوقت الدراسة المذكورة عن دراستنا بعدد العينات حيث كان عدد مرضى السرطان شائك الخلايا 95 بينما عدد حالات الشاهد 656 مما يعطي نتائج Jiang, W.- W. وزملائه موثوقية عالية، ورغم اختلاف الدراستين بعدد العينات وطبيعة العينة والمورّث المدروس.(Jiang *et al.*, 2005) فقد توافقت النتائج بينها مما يدل على تاثير التدخين الكبير على الدنا المتقدري.

حتى الآن، ناقشت العديد من الدراسات زيادة بين عدد نسخ mtDNA وعوامل الخطر لسرطان الرأس والعنق HNSCC، ولكن النتائج كانت غير ثابتة بكل الدراسات. حيث اختلفت دراستنا مع دراسة Dang, S., *et al.*, وزملائه، إذ لوحظ نقصان عدد نسخ الدنا المتقدري عند المدخنين مقارنة بغير المدخنين وخاصة لدى المرضى الذين يعانون من أورام في المرحلة المبكرة، ولكن ليس في أولئك الذين يعانون من أورام في المرحلة المتأخرة. قد يرجع ذلك إلى وجود طفرات في منطقة (D-loop)، وهي منطقة غير مشفرة لكنها ضرورية لتضاعف ونسخ mtDNA، وبالتالي تقليل عدد نسخ mtDNA أو تغيير التعبير الجيني له، كما تشير هذه البيانات إلى أن محتوى mtDNA المنخفض يمكن أن يتنبأ بمعدل البُقياء (البقاء) الأسوأ في مرضى سرطان الحنجرة في المراحل المبكرة ، كما تدعمه دراسة سابقة في أن انخفاض عدد نسخ mtDNA قد يؤدي إلى تحمل أكبر لنقص الأكسجة، ويجعل الخلايا السرطانية تقلل من اعتماد المتقدرات على الفسفرة التأكسدية والحصول على الطاقة اللازمة لتطور الورم بشكل رئيسي من الأيض اللاهوائي، مما يساهم بشكل أكبر في غزو الخلايا

السرطانية والبقاء على قيد الحياة في ظل ظروف نقص الأكسجين (Dang *et al.*, 2014) (Stoeltzing *et al.*, 2004)

الاستنتاج:

تقدم هذه الدراسة دليلًا على أن زيادة محتوى mtDNA في HNSCC يرتبط ارتباطًا وثيقًا بعادات التدخين المسؤولة عن الشدة التأكسدية. وتعتبر هذه الدراسة الأولى في سوريا لإثبات فائدة الخزعة السائلة من خلال مراقبة محتوى cfmtDNA لعوامل الخطر كالتدخين في HNSCC لسرطان شائك الخلايا في الرأس والعنق كمؤشر تشخيصي غير باضع ومبكر، كما يمكن القول ان محتوى DNA المتقدري مؤشر تنبيئي أكثر من كونه تشخيصي مما يجدر ذكرة اننا لم نتطرق لدراسة الفرق بين التدخين والأكيلة وذلك لقلة العينات المدخنين بالأكيلة في بحثتنا هذا مما يوصى به الباحث في الدراسات المستقبلية.

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

References:

1. Alqahtani, W. S., Almufareh, N. A., Al-Johani, H. A., Alotaibi, R. K., Juliana, C. I., Aljarba, N. H., . . . Ahmed, H. G. (2020). Oral and oropharyngeal cancers and possible risk factors across Gulf Cooperation Council countries: a systematic review. World Journal of Oncology, 11(4), 173.
2. Bugshan, A., & Farooq, I. (2020). Oral squamous cell carcinoma: Metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. F1000Research, 9.
3. Chow, L. Q. (2020). Head and neck cancer. New England Journal of Medicine, 382(1), 60-72.
4. Dang, S., Qu, Y., Wei, J., Shao, Y., Yang, Q., Ji, M., . . . Hou, P. (2014). Low copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts worse prognosis in early-stage laryngeal cancer patients. Diagnostic pathology, 9(1), 1-9.
5. Duan, X., Yang, Y., Zhang, H., Liu, B., Wei, W., Wang, L., . . . Zhou, X. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, miRNA genetic variations, and associated leukocyte mitochondrial DNA copy number: A cross-sectional study in China. Chemosphere, 246, 125773.
6. Fliss, M. S., Usadel, H., Caballero, O. L., Wu, L., Buta, M. R., Eleff, S. M., . . . Sidransky, D. (2000). Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. Science, 287(5460), 2017-2019.
7. Giudice, A., Liborio, F., Averta, F., Barone, S., & Fortunato, L. (2019). Oral lichenoid reaction: an uncommon side effect of rituximab. Case reports in dentistry, 2019.
8. Ibrahim, B. A., Al-Humaish, S., & Al-Obaide, M. A. (2018). Tobacco smoking, lung cancer, and therapy in Iraq: current perspective. Frontiers in public health, 6, 311.
9. Jiang, W.-W., Masayesva, B., Zahurak, M., Carvalho, A. L., Rosenbaum, E., Mambo, E., . . . Westra, W. H. (2005). Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer. Clinical Cancer Research, 11(7), 2486-2491.
10. Kabalan, M., El-Hajj, M., Khachman, D., Awada, S., Rachidi, S., Al-Hajje, A., & Ajrouche, R. (2021). Public awareness of environmental risk factors of cancer and attitude towards its prevention among the Lebanese general population. Journal of preventive medicine and hygiene, 62(2), E466.
11. Kumar, M., Srivastava, S., Singh, S. A., Das, A. K., Das, G. C., Dhar, B., . . . Mondal, R. (2017). Cell-free mitochondrial DNA copy number variation in head and neck squamous cell carcinoma: a study of non-invasive biomarker from Northeast India. Tumor Biology, 39(10), 1010428317736643.
12. Lee, Y. C. A., Li, S., Chen, Y., Li, Q., Chen, C. J., Hsu, W. L., . . . Shen, H. (2019). Tobacco smoking, alcohol drinking, betel quid chewing, and the risk of head and neck cancer in an East Asian population. Head & neck, 41(1), 92-102.
13. Lewandowska, A. M., Rudzki, M., Rudzki, S., Lewandowski, T., & Laskowska, B. (2019). Environmental risk factors for cancer-review paper. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 26(1).
14. Li, F., Wei, F., Huang, W.-L., Lin, C.-C., Li, L., Shen, M. M., . . . Tu, M. (2020). Ultra-Short Circulating Tumor DNA (usctDNA) in Plasma and Saliva of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients. Cancers, 12(8), 2041.
15. López-Ozuna, V. M., Gupta, I., Kiow, R. L. C., Matanes, E., Kheraldine, H., Yasmeen, A., . . . Al Farsi, H. F. (2020). Water-Pipe Smoking Exposure Deregulates a Set of Genes Associated with Human Head and Neck Cancer Development and Prognosis. Toxics, 8(3), 73.
16. Malik, A. N., & Czajka, A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? Mitochondrion, 13(5), 481-492.

17. Mondal, R., Ghosh, S. K., Choudhury, J. H., Seram, A., Sinha, K., Hussain, M., . . . Ganguli, S. (2013). Mitochondrial DNA copy number and risk of oral cancer: a report from Northeast India. PloS one, 8(3), e57771.
18. Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Bahadar, H., Hassan, F. I., & Abdollahi, M. (2017). Smokeless tobacco (paan and gutkha) consumption, prevalence, and contribution to oral cancer. Epidemiology and health, 39.
19. Panta, P., & Wong, D. T. (2019). Salivary biomarkers in oral cancer Oral Cancer Detection (pp. 265-295): Springer.
20. Serindere, G., Bolgul, B., Gursoy, D., Hakverdi, S., & Savas, N. (2019). Comparison of Head and Neck Cancer Distribution in Turkish and Syrian Populations. Iranian journal of public health, 48(10), 1810.
21. Shingala, U. Environmental Factors and Terminal Cancer Development-Review Article.
22. Stoeltzing, O., McCarty, M. F., Wey, J. S., Fan, F., Liu, W., Belcheva, A., . . . Ellis, L. M. (2004). Role of hypoxia-inducible factor 1α in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. Journal of the National Cancer Institute, 96(12), 946-956.
23. Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2021). Oxidative stress, diet and prostate cancer. The world journal of men's health, 39(2), 195.
24. Vučičević Boras, V., Fučić, A., Baranović, S., Blivajs, I., Milenović, M., Bišof, V., . . . Bruzzone, M. (2019). Environmental and behavioural head and neck cancer risk factors. Central European journal of public health, 27(2), 106-109.
25. Wang, L., Lv, H., Ji, P., Zhu, X., Yuan, H., Jin, G., . . . Ma, H. (2018). Mitochondrial DNA copy number is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma in Chinese population. Cancer medicine, 7(6), 2776-2782.
26. Wu, S., Li, X., Meng, S., Fung, T., Chan, A. T., Liang, G., . . . Nan, H. (2019). Fruit and vegetable consumption, cigarette smoke, and leukocyte mitochondrial DNA copy number. The American journal of clinical nutrition, 109(2), 424-432.
27. Zhou, W., Zhu, M., Gui, M., Huang, L., Long, Z., Wang, L., . . . Dai, Y. (2014). Peripheral blood mitochondrial DNA copy number is associated with prostate cancer risk and tumor burden. PloS one, 9(10), e109470.