

بررسی فراوانی جهش‌های ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره در کرمان

محمدعلی دامغانی^{۱*}، محمدرضا بذرافشانی^۲، تورج‌رضا میرشکاری^۳

خلاصه

مقدمه: سرطان حنجره دومین سرطان شایع دستگاه تنفسی بعد از سرطان ریه می‌باشد. سرطان‌زایی یک روند پیچیده چند مرحله‌ای می‌باشد؛ ژنتیک مولکولی شواهدی را فراهم آورده است که نشان می‌دهد فعال شدن پروتوانکوژن و از بین رفتن یا غیرفعال شدن TSG (Tumor suppressor gene) در بدخیمی‌های متعددی وجود دارد. یکی از TSGهای شناخته شده در سرطان‌های سلول سنگفرشی سر و گردن، ژن P53 می‌باشد که در فعالیت‌های مهارری رشد سلول نقش دارد؛ به نحوی که وقتی P53 حذف یا خاموش شود، سلول یک برتری رشد انتخابی پیدا می‌کند و تبدیل به سرطان می‌شود. در بدخیمی‌هایی که جهش در P53 اتفاق می‌افتد، بیماران پاسخ درمانی ضعیف‌تر و طول عمر کمتری دارند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی جهش ژن P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره و انتخاب روش درمانی مناسب برای این بیماران بود.

روش: برای نمونه‌های مورد آزمایش از بلوک‌های پارافینه ۵۲ بیمار، که تحت عمل برداشتن حنجره به علت سرطان قرار گرفته بودند، استفاده شد. جهش ژن P53 در تمام طول ژن از اکزون ۱ تا ۱۲، با روش MLPA (Multiple ligation probe amplification) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۸۰/۸ درصد از ۵۲ نمونه مورد استفاده، جهش ژن P53 مشاهده گردید که ۵۹/۶ درصد موارد به صورت حذف (Deletion) در اکزون‌های ۱، ۳، ۴، ۹ و ۱۲ بود؛ ۲۱/۲ درصد موارد نیز به صورت افزایش (Duplication) در اکزون‌های ۱، ۲، ۷، ۸ و ۱۱ رخ داده بود. در مواردی هم حذف هم‌زمان در بیش از یک اکزون و هم‌این‌طور اضافه شدن هم‌زمان در بیش از یک اکزون مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه و این که تشخیص قطعی سرطان حنجره با انجام نمونه‌برداری و بررسی بافت‌شناسی انجام می‌شود، پیشنهاد می‌گردد که در تمامی نمونه برداری‌های انجام شده جهش ژن P53 بررسی شود و با توجه به نتیجه این بررسی، در مورد انتخاب روش درمانی مناسب برای بیماران تصمیم‌گیری گردد.

واژه‌های کلیدی: جهش، P53، سرطان، MLPA، حنجره

۱- استادیار، گروه گوش و حلق و بینی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- متخصص پاتولوژی بالینی، بیمارستان شفاء، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
* نویسنده مسؤول، کرمان، انتهای خیابان شفاء، بیمارستان شفاء، گروه گوش و حلق و بینی • آدرس پست الکترونیک: damghani.ma@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۲

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۰/۳/۱۰

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۲

مقدمه

سرطان حنجره حدود ۲/۲ درصد تمام سرطان‌ها در مردان و ۰/۴ درصد سرطان در زنان را تشکیل می‌دهد و دومین سرطان شایع دستگاه تنفسی بعد از سرطان ریه می‌باشد (۱، ۲). سن شایع بروز بیماری را دهه پنجم زندگی به بعد ذکر می‌کنند. در گذشته شیوع بیماری در مردان نسبت به زنان ۱۵ به ۱ بوده و هم اکنون این نسبت به ۵ به ۱ رسیده است که به علت تغییر در عادات اجتماعی زنان، به ویژه مصرف سیگار، می‌باشد (۳). شیوع سرطان حنجره در مناطق جغرافیایی گوناگون تغییر می‌کند؛ به طوری که بالاترین شیوع از آمریکای جنوبی و کشورهای حوزه مدیترانه گزارش شده و کمترین شیوع مربوط به کشور فنلاند بوده است (۴).

عوامل خطر ساز متعددی در منابع گوناگون آمده است که از جمله مصرف زیاد سیگار، جویدن Snuff، مصرف زیاد الکل و بعضی فاکتورهای شغلی قابل ذکر می‌باشد (۵). Dolivet و همکاران مصرف تنباکو را، به دلیل وجود بنزوپیرن موجود در آن که یک موتاژن می‌باشد، مهم‌ترین عامل موتاسیون P53 معرفی کرده‌اند (۶). در مطالعه موسوی و همکاران نیز نشان داده شد که مصرف ایپوم یک عامل خطر ساز در بروز سرطان حنجره می‌باشد (۷). بیماران مورد مطالعه در این طرح، سیگار و ایپوم را به‌طور هم‌زمان مصرف می‌کردند.

رابطه ایجاد سرطان و موتاسیون ژن P53 در نسوج مختلف نظیر حنجره، به از دست دادن کنترل طبیعی چرخه سلولی، که اساس تغییر شکل بدخیمی است، برمی‌گردد. در بیشتر موارد سرطان‌های انسان، حداقل یکی از چهار تنظیم کننده کلیدی چرخه سلولی، یعنی P16INK4a، سیکلین D، CDK4 و پروتئین RB، تنظیم خود را از دست می‌دهند (۸). سرطان‌زایی یک روند پیچیده چندمرحله‌ای است؛ ژنتیک مولکولی شواهدی را فراهم آورده است که نشان می‌دهد فعال شدن پروتوانکوژن و از بین رفتن یا غیرفعال شدن TSG

(Tumor suppressor gene) در بدخیمی‌های متعددی وجود دارد (۹).

آنکوژن‌ها فراورده‌هایی را که به‌طور طبیعی در طول دوره حیات یک سلول تولید می‌شوند، به رمز در می‌آورند؛ ولی هنگامی که این فراورده‌ها به‌صورت نابهنجار بروز نمایند، رشد انتخابی پیدا می‌کنند و ممکن است به‌صورت فاکتورهای آنتی Apoptotic، محرک رگ‌زایی (Angiogenic) یا محرک رشد بروز نمایند. آنکوژن‌ها اغلب به میزان کم به‌طور طبیعی وجود دارند و ممکن است در هر تنوالی غیرطبیعی DNA شرکت نکنند. از این رو، تکنیک‌های مولکولی، که آنکوژن‌های غیرطبیعی را نشان دهند، خیلی محدود هستند (۱۰). نقطه مقابل آنکوژن‌ها TSG است. این ژن‌ها اغلب نقشی در فعالیت‌های مهارى رشد نظیر Apoptosis، DNA repair cell cycle regulation و Cell adhesion دارند؛ بنابراین وقتی TSG حذف یا خاموش شود، سلول یک برتری رشد انتخابی پیدا می‌کند و به سرطان تبدیل می‌گردد. یکی از TSG‌های شناخته شده در سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن P53 است که یک فاکتور رونویسی کننده ژن می‌باشد و روی کروموزوم P13 17 قرار دارد، P53 در موقعیت‌هایی نظیر پرتودرمانی هیپوکسی و در معرض توکسین‌های محیطی قرار گرفتن سلول فعال می‌شود (۱۱). فعال شدن P53 سلول‌ها را به مسیر Apoptosis می‌فرستد و می‌تواند رشد را از طریق کنترل سیکل سلولی تنظیم نماید؛ به همین دلیل است که P53 نقشی حیاتی در نگهداری و رشد سلول‌های سرطانی دارد (۱۲).

نشان داده شده است که ضایعات قبل از بدخیمی ناحیه سر و گردن نیز جهش‌های P53 را حمل می‌کنند و پیشنهاد شده است که این جهش می‌تواند یک رویداد اولیه باشد (۱۳)؛ در بدخیمی‌هایی که جهش در P53 اتفاق می‌افتد، بیماران پاسخ درمانی ضعیف‌تر و طول عمر کمتری دارند (۱۴، ۱۵).

۳) واکنش الحاقی (روز دوم)

برای تهیه مخلوط واکنش لیگاز، ۳ µl از بافر لیگاز A65، ۳ µl از بافر لیگاز B65 و ۲۵ µl از آب دیونیزه با هم مخلوط شد و سپس ۱ µl از آنزیم لیگاز ۶۵ به مخلوط واکنش اضافه گردید. برنامه ترموسایکلر در ۵۴ درجه سانتی‌گراد متوقف شد و ۳۲ µl از مخلوط واکنش لیگاز به هر تیوب واکنش اضافه و پیست گردید؛ برای واکنش الحاقی محلول ۱۵ دقیقه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد برای غیرفعال‌سازی آنزیم لیگاز ۶۵، ۵ دقیقه در ۹۸ درجه سانتی‌گراد حرارت دید.

۴) واکنش PCR (روز دوم)

برای تهیه مخلوط بافر PCR، ۴ µl از بافر SALSA PCR به اضافه‌ی ۲۶ µl از آب مقطر دیونیزه را مدت کوتاهی ورتکس کرده، ۳۰ µl از آن را به هر میکروتیوب اضافه کردیم؛ سپس ۱۰ µl از مخلوط واکنش الحاقی را به میکروتیوب PCR اضافه کردیم. ۲ µl از پرایمرهای PCR SALSA، ۲ µl بافر رقیق‌کننده آنزیم SALSA، ۵/۵ µl از dH₂O ۰/۵ µl از پلیمراز SALSA برای تهیه مخلوط پلیمراز با هم مخلوط کردیم. به میکروتیوب‌ها در ۶۰ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر ۱۰ µl از مخلوط پلیمراز اضافه شد و برنامه شامل ۳۵ سیکل، ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد اجرا گردید.

۵) پس از ارزیابی الگوهای پیکی به دست آمده در این مرحله، داده‌های خام توسط نرم‌افزار Gene Marker با استفاده از پنل اختصاصی کیت (P056) و با نرمال‌سازی داده‌ها بر اساس شاهد‌های منفی و شاهد‌های داخلی مورد آنالیز قرار گرفت و بر اساس مقایسه شدت هر پیک در نمونه بیمار با شدت همان پیک در شاهد منفی، Deletion و Duplicationها در هر نمونه بیمار تعیین گردید (۱۷).

اطلاعات حاصل از مطالعه بیولوژی مولکولی سرطان‌های سر و گردن می‌تواند به پیش‌بینی این که چه کسانی در معرض ابتلا به سرطان هستند، محاسبه پاسخ عوامل پیش‌گیری کننده، شناسایی پلان‌های درمانی جدید و پیش‌بینی پاسخ بیماران به رادیوتراپی یا شیمی‌درمانی کمک کند (۱۶).

روش بررسی

ابتدا بلوک‌های سرطان حنجره از فایل‌های پاتولوژی بیماران در کلیه بیمارستان‌های کرمان جمع‌آوری و سپس خصوصیات پاتولوژی و دموگرافیک آن‌ها مشخص گردید. سپس حدود ۲۵ میلی‌گرم از بافت پارافینه با میکروتوم به صورت نازک (ضخامت ۱ میلی‌متر) برش زده شد. برش‌ها سه بار با زایلن شستشو گردید و پس از پارافین‌زدایی و لیز کردن بافت‌ها، DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن استخراج شد؛ تعیین موتاسیون‌های ژن TP53 [بررسی حذف (Deletion) و افزایش (Duplication)] با استفاده از روش MLPA (Multiple ligation probe amplification) انجام گردید. واکنش MLPA به شرح ذیل انجام شد:

۱) واسرشت‌سازی DNA (روز اول)

۵ µl از هر نمونه DNA داخل تیوب ۰/۲ ریخته و در ترموسایکلر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا نمونه‌ها واسرشت شوند.

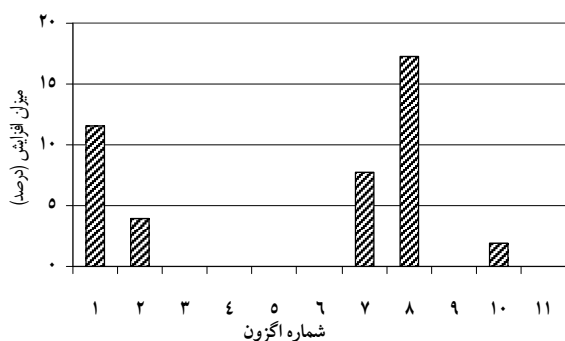
۲) واکنش هیبریدیزاسیون (روز اول)

۱/۵ µl بافر MLPA همراه با ۱/۵ µl از مخلوط پروبی برای هر واکنش به خوبی مخلوط و به نمونه واسرشت شده اضافه گردید. سپس برنامه ترموسایکلر یک دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۰-۱۶ ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد اجرا شد.

نتایج

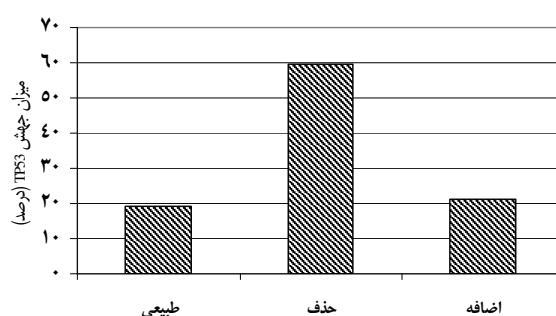
در ۵۲ نمونه حنجره جراحی شده به علت بدخیمی از نوع سلول سنگفرشی، جهش ژن P53 با استفاده از روش MLPA مورد بررسی قرار داده شد که در ۸۰/۸ درصد نمونه‌ها جهش اتفاق افتاد؛ این جهش به صورت حذف (۵۹/۶ درصد) یا افزایش (۲۱/۲ درصد) در ژن مورد نظر بود (نمودار ۱). موارد حذف در آگزون‌های ۱، ۳، ۴، ۶، ۹ و ۱۲ بود که بیشترین میزان آن در آگزون ۱ و ۳ به میزان ۳۸ و ۴۵ درصد رخ داد. در آگزون‌های ۲، ۴، ۵، ۷، ۸ و ۱۱ حذف مشاهده نگردید (نمودار ۲).

موارد جهش به صورت افزایش در آگزون‌های ۱، ۲، ۷، ۸ و ۱۱ اتفاق افتاد و بیشترین میزان این نوع جهش به ترتیب در آگزون‌های ۸، ۱ و ۷ بود (نمودار ۳). در بعضی نمونه‌ها حذف نوکلئوتیدی هم‌زمان به صورت ترکیبی در آگزون‌های (۱ و ۳)، (۳، ۴، ۶ و ۹) و (۹ و ۱۲) اتفاق افتاد که شیوع آن به ترتیب ۲۲، ۴ و ۳ درصد تعیین شد (نمودار ۴)؛ بیشترین حذف نوکلئوتیدی هم‌زمان در آگزون‌های یک و سه بود. در نمونه‌هایی که به‌طور هم‌زمان تکثیر نوکلئوتیدی در ژن اتفاق افتاده بود



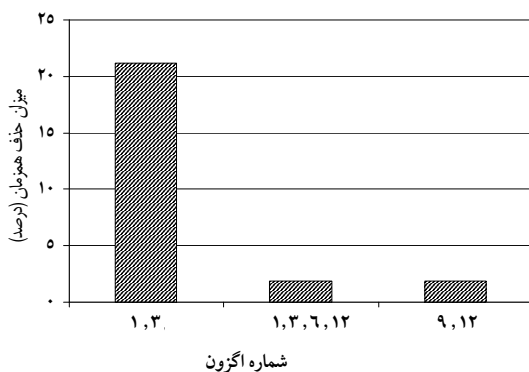
نمودار ۳. میزان افزایش (Duplication) بر حسب درصد در

آگزون‌های ۱ تا ۱۲ ژن TP53



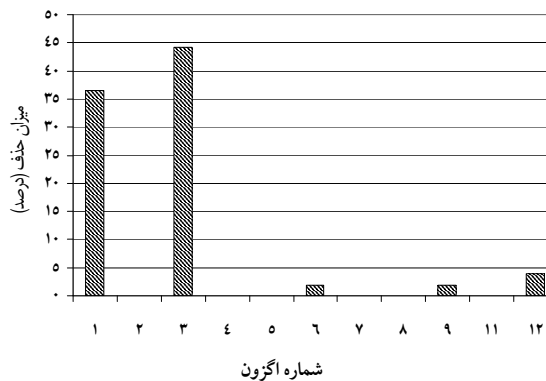
نمودار ۱. مقایسه میزان جهش در آگزون‌های ژن TP53 در مقایسه

با افراد طبیعی بر حسب درصد



نمودار ۴. مقایسه میزان حذف هم‌زمان در آگزون‌های ژن TP53

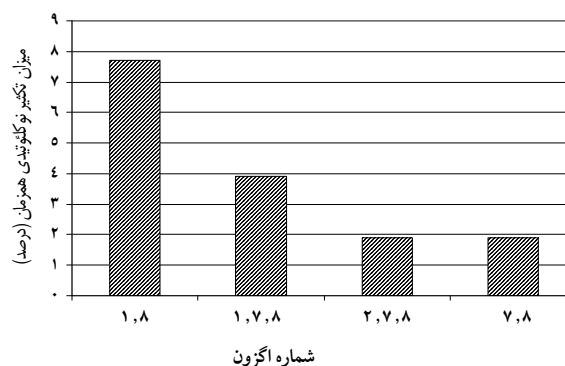
بر حسب درصد



نمودار ۲. میزان حذف (Deletion) بر حسب درصد در آگزون‌های

TP53 ۱ تا ۱۲ ژن

به ترتیب فراوانی در آگزون‌های (۱ و ۸)، (۱، ۸ و ۷)، (۸ و ۷) و (۷ و ۸) بود و بیشترین میزان تکثیر هم‌زمان در آگزون‌های (۱ و ۸) مشاهده شد (نمودار ۵).



نمودار ۵. مقایسه میزان تکثیر نوکلئوتیدی هم‌زمان در آگزون‌های ژن TP53 بر حسب درصد

تومورهای دارای P53 طبیعی به چنین درمانی بیشتر پاسخ می‌دهند تا تومورهایی که آلل‌های جهش‌یافته ژنی با خود دارند؛ استراتژی‌های درمانی مختلفی با هدف افزایش فعالیت P53 طبیعی در سلول‌های توموری که این نوع فعالیت خود را حفظ کرده‌اند، یا نابودی انتخابی سلول‌هایی که نقص عملکرد P53 دارند، در دست تحقیق است (۲۰، ۸).

کاربرد دیگر بررسی جهش P53، برای اطمینان از کامل بودن برداشتن حاشیه تومور حین عمل جراحی است؛ در مطالعه Jin و همکاران بیان شده است که بهترین راه برای تصمیم‌گیری حدود مطمئن برداشتن تومور نه فقط پاتولوژی، که ژنتیک مولکولی حاشیه‌های تومور است (۹). از لحاظ بالینی جهش ژن P53 در سرطان‌های سلول سنگفرشی مناطق مختلفی از بدن نظیر حنجره ثابت گردیده است (۲۱).

هدف از این مطالعه، پیدا کردن شیوع جهش P53 در بیماران مبتلا به سرطان حنجره که به‌طور اولیه تحت عمل برداشتن حنجره قرار گرفته‌اند، بود. روش مورد استفاده جهت بررسی جهش ژن P53، MLPA بود که روی ۵۲ نمونه حنجره جراحی شده به‌علت بدخیمی از نوع سلول سنگفرشی انجام شد. نتیجه حاکی از آن بود که در ۸/۸ درصد نمونه‌ها جهش P53 اتفاق افتاده که این جهش در ۶/۵۹ درصد به‌صورت Deletion و در ۲/۲۱ درصد به‌صورت Duplication بوده است.

Tjebbes و همکاران با روش Sequencing و در تمام طول ژن به بررسی پرداختند و وجود جهش P53 را در ۷۳ درصد سرطان‌های حنجره که به‌طور اولیه با جراحی درمان شده بودند، گزارش کردند. یافته دیگر این بود که جهش P53 در همه سرطان‌های حنجره مقاوم به پرتودرمانی وجود داشت (۲۲).

در مطالعه‌ای دیگر، Ronchetti و همکاران با روش PCR در سرطان‌های سر و گردن به بررسی جهش ژن P53 روی آگزون‌های ۵ تا ۸ پرداختند که فراوانی جهش P53 را در

بحث

آنالیز ایمنووهیستوشیمیایی نمی‌تواند انواع مختلف جهش‌های ژن P53 را مشخص نماید؛ به‌علاوه، این تکنیک نمی‌تواند فریم‌شفت‌ها و جهش‌های Non sense را مشخص کند. بنابراین، از آن جایی که ۳/۱۱ درصد جهش‌های این ژن از نوع فریم‌شفت و ۵/۷ درصد آن‌ها به شکل None sense است، این آنالیز نمی‌تواند پاسخگو باشد (۱۸). برای مشخص کردن جهش‌های ژن P53 باید تمامی ناحیه ژن P53 از آگزون ۱ تا ۱۲، که Splice Junctionها را نیز در بر دارد، آنالیز شود (۱۹). جهت رفع این مشکل بایستی از روش‌های مولکولی جدید مانند MLPA استفاده نمود. توانایی P53 برای کنترل آپوپتوز در پاسخ به صدمه DNA نه تنها در جلوگیری از ایجاد سرطان نقش دارد، بلکه در اقدامات درمانی هم نقش مهمی می‌پذیرد. پرتودرمانی و شیمی‌درمانی، دو روش شایع درمان سرطان، اثرات خود را به‌وسیله تحریک صدمه DNA و متعاقب آن آپوپتوز اعمال می‌کنند.

عمل و مرگ) در بیماران با سرطان سر و گردن، که ابتدا پرتودرمانی می‌گیرند و جراحی نمی‌شوند، وجود دارد (۲۵). با توجه به نتایج این مطالعات و مطالعات مشابه دیگر پیشنهاد می‌شود که بررسی جهش ژن P53 روی تمامی نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به سرطان حنجره انجام شود تا بتوان راهکار صحیح و مؤثر را جهت طرح درمانی این بیماران انتخاب نمود؛ راهکاری که با استفاده از آن، بیشترین نتایج درمانی در این بیماران حاصل شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان، که هزینه‌های مالی این تحقیق را فراهم نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۳۳ درصد موارد گزارش کردند (۲۳). این تفاوت نتایج به علت روش مورد استفاده و بررسی کردن محدود اکزون‌های ۵ تا ۸ بوده است.

Vielba و همکاران گزارش کرده‌اند که می‌توان با مشخص کردن جهش P53 در بافت‌های بیوپسی حنجره، پیش‌آگهی دقیق‌تر بیماران با سرطان سلول سنگفرشی حنجره را پیش‌گویی نمود؛ به نحوی که بروز جهش P53 همراه با طول عمر کمتر بیمار و دوران بدون بیماری کوتاه‌تر خواهد بود (۲۴).

در پژوهش Alsner و همکاران نیز مشخص گردید که یک ارتباط قوی بین جهش P53 و پیش‌آگهی ضعیف (افزایش خطر شکست کنترل بیماری در محل و منطقه

References

1. Lee SS, Ro JY, Luna MA, Batsakis JG. Squamous cell carcinoma of the larynx in young adults. *Semin Diagn Pathol* 1987; 4(2): 150-2.
2. Mendez P, Maves MD, Panje WR. Squamous cell carcinoma of the head and neck in patients under 40 years of age. *Arch Otolaryngol* 1985; 111(11): 762-4.
3. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(1): 8-29.
4. Birchall MA, Pope L. Tumors of the Larynx. In: Scott-Brown GW, Editor. *Scott-Brown's otorhinolaryngology, head and neck surgery*. 7th ed., Chicago, Hodder Arnold 2008. p2602.
5. Sugar J, Vereczkey I, Toth J. Some etiopathogenetic factors in laryngeal carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1996; 15(2-4): 195-9.
6. Dolivet G, Colosetti P, Merlin JL, Depardieu C, Lapeyre M, Wattel E, et al. Elements of epidemiology and initiation of carcinogenesis in carcinomas of the upper aerodigestive tract. Future therapeutic consequence? *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 1999; 120(1): 5-12.
7. Mousavi MR, Damghani MA, Haghdoost AA, Khamesipour A. Opium and risk of laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2003; 113(11): 1939-43.
8. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2(2): 103-12.
9. Jin X, Zhou L, Zhao A. Mutants of p53 gene presence in laryngeal carcinoma and adjacent histopathologically normal tissue. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000; 62(3): 140-2.
10. Chang S, Ha P. Biology of Head and Neck cancer. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ (Editors), *Cummings otolaryngology head and neck surgery*. 5th ed., Philadelphia, Mosby Elsevier, 2010; pp1019-20.

11. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116(2): 235-46.
12. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19(6): 607-14.
13. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53(19): 4477-80.
14. Bradford CR, Zhu S, Ogawa H, Ogawa T, Ubell M, Narayan A, et al. P53 mutation correlates with cisplatin sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma lines. *Head Neck* 2003; 25(8): 654-61.
15. Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18(2): 385-94.
16. William B, Armstrong DE, Vokes RH, Maisel. Malignant tumors of the larynx. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ (Editors), Cummings otolaryngology-head and neck surgery. Philadelphia, Mosby Elsevier; 2010; p 1492.
17. MLPA information. MRC-Holland. Description version [Online]. 2009; Available from: URL: <http://www.MLPA.com/>
18. Ferrari P, Trentini GP, De GC, Caragnani L, Righi E, Ferrari G. Molecular biology in bladder carcinoma: contributions of immunohistochemistry. *Arch Ital Urol Androl* 1997; 69(4): 271-7.
19. MLPA Kit-Po56-A2 TP3. MRC-Holland. Description version [Online]. 2008; Available from: URL: <http://www.MLPA.com/>
20. Biederer C, Ries S, Brandts CH, McCormick F. Replication-selective viruses for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80(3): 163-75.
21. Onel K, Cordon-Cardo C. MDM2 and prognosis. *Mol Cancer Res* 2004; 2(1): 1-8.
22. Tjebbes GW, Kreijveld PA, Tilanus MG, Hordijk GJ, Slootweg PJ. P53 tumor suppressor gene mutations in laryngeal cancer and in recurrent disease following radiation therapy. *Oral Oncol* 2002; 38(3): 296-300.
23. Ronchetti D, Neglia CB, Cesana BM, Carboni N, Neri A, Pruneri G, et al. Association between p53 gene mutations and tobacco and alcohol exposure in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(3): 303-6.
24. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, et al. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003; 113(1): 167-72.
25. Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 2001; 59(2): 179-85.

The Prevalence of P53 Mutations in Laryngeal Cancer in Kerman

Damghani M.A., M.D.^{1*}, Bazrafshani M.R., Ph.D.², Mirshekari T.R., M.D.³

1. Assistant Professor of Ear, Nose and Throat, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Assistant Professor of Medical Genetics, Physiology Research Center & Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Clinical Pathologist, Shafa Hospital, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: Damghani.ma@yahoo.com

(Received: 1 Feb. 2011 Accepted: 13 Sep. 2011)

Abstract

Background & Aims: Laryngeal cancer is the second common cancer of respiratory tract, following the lung cancer. Carcinogenesis is a complex multistage process; molecular genetics has provided the evidence that activation of proto-oncogene and loss or inactivation of tumor suppressor genes (TSG) are involved in a large number of malignancies. One of the earliest significant tumor suppressor genes identified in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) was P53 have a role in growth suppression activities. Thus, when P53 is deleted or silenced, the cell develops a selective growth advantage and becomes a cancer. Mutations in P53 are correlated with poorer survival and response to treatment. The aim of this study was to survey the prevalence of P53 gene mutation in patients with laryngeal cancer and to select an appropriate method of treatment.

Methods: The samples were 52 patients with laryngeal cancer diagnosis have been treated by surgery. Investigation of TP53 mutation where performed by multiple ligation probe amplification (MLPA) technique which analyze the full length of gene from exon 1 to 12.

Results: The TP53 mutation was discovered in 80.8 percent of samples. By contrast between two main forms of mutation (i.e. deletions and duplications), we found that the deletions mostly occurred within exons 1, 3, 6, 9 and 12 by 59.6 percent and duplications observed in exons 1, 2, 7, 8 and 11 by 21.2 percent.

Conclusion: Considering our results and reminding this fact that nowadays the definitive diagnosis of laryngeal cancer is made using biopsy and pathology techniques, we suggest that all biopsy specimens should be tested and those confirmed positive for TP53 mutations need some further decisions by physicians.

Keywords: Mutation, P53, Cancer, Multiple ligation probe amplification (MLPA), Larynx