شناسائی DNA ویروس پاپیلوم انسانی از نوع ۱۶و۱۸ در نمونه های سرطان سلول سنگفرشی حنجره فیکس شده در فرمالین و بلوک شده در پارافین به روش Semi nested PCR

دکتر فروزان محمدی، میهن پور عبدالله، دکتر والری باکایف، ا قا یی ، دکتر شیرین کریمی

چکیده: ویروس پاپیلوم انسانی ارتباط ثابت شده‌ای با پیدایش بدخیمی های سلول سنگفرشی در ارگانهای مختلف بدن دارد ولی ارتباط آن باکارسینومهای حنجره هنوز مورد بحث و مجادله است. مطالعات قبلی احتمال همراهی سرطانهای حنجره با HPV را مطرح کرده اند . **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی همراهی پاپیلوم انسانی از نوع ۱۶و۱۸ در نمونه های بافتی فیکس شده در فرمالین و بلوک شده در پارافین بیماران با سرطان سلول سنگفرشی حنجره دو بیمارستان مسیح دانشوری و لقمان حکیم بوده است . **مواد وروشها:** کلیه نمونه های با تشخیص سرطان سلول سنگفرشی حنجره از فایل پاتولوژی بیمارستانهای مسیح دانشوری و لقمان حکیم در فاصله زمانی ۵ ساله (۱۳۸۲-۱۳۷۷) استخراج شده , پس از بازبینی و انتخاب نمونه های کافی از بلوک های نمادین هر مورد برشهای ۱۰میکرونی تهیه شد و شناسائی DNA ویروس پاپیلوم انسانی به روش Semi nested PCR انجام گردید. **یافته ها :** تعداد ۵۱ بلوک پارافینی مربوط به نمونه های بیوپسی حنجره و لارنژکتومی با تشخیص سرطان سلول سنگفرشی حنجره جمع آوری گردید از این تعداد ۳۵ نمونه میزان نسج تومورال کافی جهت تحقیق را دارا بودند که در نهایت ۲ نمونه دیگر به دلیل نتایج PCR منفی برای ژن HFE ازجریان مطالعه حذف شدند و ۳۳ نمونه مورد برسی قرار گرفتند . DNAویروس در ۵ بیمار (۱۵٪) شناسائی شد.HPV16در ۴ بیمار (۱۲٪) وHPV 18 در یک بیمار (۳٪) بود هیچکدام از نمونه ها برای هر دو نوع HPVتواما مثبت نبودند. **نتیجه گیری:** همراهی حدود ۱۵٪ از نمونه های بافتی سرطان سلولهای سنگفرشی حنجره با ویروس پاپیلوم انسانی می‌تواند مطرح کننده نقش احتمالی این ویروس در سرطان زائی باشد. **واژگان کلیدی:** پاپیلوماویروس، سرطان حنجره، Semi nested pcr.

مقدمه

تخمین جهانی برای سال۲۰۰۵ بیش از ۱۶۰ هزار مورد جدید سرطان حنجره برای مردان و۲۲۰۰۰ مورد جدید برای زنان را پیش بینی میکنند. اغلب بدخیمی های حنجره را می‌توان به مصرف سیگار و الکل ارتباط داد .فاکتورهای خطر همزمان اثر مضا ربه ای را ایفا میکنند .از دیگر فاکتورهای خطر احتمالی کمبود مواد غذائی نا چیز(Micronutrients), در معرض قرار گرفتن های شغلی و بیماری رفلاکس معده ای - مروی را میتوان نام برد.(۱و۲) : تعدادی از گزارشهای اخیر احتمال نقش ویروس پاپیلوم انسانی در سرطان حنجره را مطرح کرده اند .(۱و۲و۳و۴و.....):نقش ویروس پاپیلوم انسانی در تومورزائی انسان بر اساس اطلاعاتی که از سرطانهای دهانه رحم به دست آمده مورد توجه قرار گرفته است (۳).

اپیتلیوم حنجره حساس به عفونت HPV بوده و قادر است تکثیر ویروس را پایا کند . قسمت عمده حنجره به جز طنابهای صوتی و سطح زبانی اپیگلوت که پوشیده از پوشش مطبق سنگفرشی است , از اپیتلیوم تنفسی پوشیده شده است . پاپیلوم ها واجد انواع HPV ۱۱و۶ هستند که از نظر نسخه برداری فعال بوده و به ندرت در موارد طول کشیده , رادیوتراپی و تماس با دود سیگار ممکن است بدخیم شوند و تنها شواهدی هستند که در آنها انواع کم خطر HPV نقشی در بدخیمی انسانی دارند .(۱)

تا به امروز بیش از ۱۰۰ ژنو تایپ جداگانه برای ویروس پاپیلوم انسانی توصیف شده است (۴) که از نظر تمایل به مناطق آناتومیک مختلف و نیز استعداد ایجاد تغییرات بدخیمی تفاوت قابل ملاحظه ای دارند (۲). از بین آنها نوع ۱۶و۱۸ به عنوان انواع پرخطر ۶و۱۱ به عنوان انواع کم خطر طبقه بندی می‌شوند .

اجزای خانواده این ویروس قابل کشت دادن در محیط آزمایشگاه نیستند . بنابراین شناسائی آنها متکی به آنالیز

مولکولی DNA ویروس است .(۵) . تکنیکهای متعددی برای شناسائی این ویروس استفاده شده است که از جمله آنها میتوان Southern blotting , dot blotting هیبریدیزاسیون در جا PCR را میتوان نام برد(۳).

مطالعات متعددی شیوع ویروس پاپیلوم انسانی را در سرطان حنجره از صفر تا ۱۰۰٪ گزارش کرده اند اما نسبتی از سرطانهای حنجره که در آنها ممکن است HPV نقش داشته باشد هنوز نامشخص است .(۷و۸و۹و۱۲و۱۳و۱۴و۱۵و۱۶).

هدف این مطالعه تعیین وجود ویروس پاپیلوم انسانی نوع ۱۸و۱۶ در نمونه های بیماران دچار سرطان سلول سنگفرشی حنجره به روش Semi nested PCR بوده است.

اگر چه در ایران مطالعاتی بر روی همراهی HPV با سرطانهای دهانه رحم و مری صورت گرفته است (۱۰و۱۱) با اطلاعات در دسترس، این مطالعه اولین گزارش همراهی سرطان حنجره و ویروس پاپیلوم انسانی در بیماران ایرانی می‌باشد.

مواد و روشها:

الف: نمونه های بافتی :

۳۳ نمونه فیکس شده در فرمالین و بلوک شده در پارافین (نمونه های لارنژکتومی و بیوپسی حنجره) با تشخیص سرطان سلول سنگفرشی حنجره در دو بیمارستان مسیح دانشوری و لقمان حکیم در یک دوره ۵ ساله (۱۳۸۲-۱۳۷۷) مورد مطالعه قرار گرفتند .

تمام نمونه ها در فرمالین با فر شده خنثی ۱۰٪ فیکس شده به طور معمول تهیه شده و در پارافین بلوک شده بودند . برای هر نمونه تمامی اسلاید های رنگ شده با روش هماتوکسیلین -ائوزین موجود مرور شدند و در صورت نامناسب بودن اسلاید اولیه ,اسلاید جدید تهیه گردیده و با بازبینی مجدد تمامی لامها, نمونه هایی که ناکافی بودند از مطالعه بعدی حذف شدند. سپس بلوکهای نمادین برای مطالعه بعدی انتخاب گردیدند.

روش PCR:

ب-۱: استخراج DNA :

DNAبه شرح ذیل از نمونه های بافتی حنجره فیکس شده در فرمالین و بلوک شده در پارافین استخراج شد:

برشهایی به ضخامت ۱۰میکرون از هر نمونه تهیه شده و در میکروتیوب هایی به حجم ۱/۵cc که استریل و درپوش دار بودند قرار داده شدند. برای جلوگیری از آلودگی نمونه ها از یک میکروتوم اختصاصی (جدا از میکروتوم بخش پاتولوژی در طبقه ای مجزا از بخش بیولوژی مولکولی) و تیغ و دستکش یکبار مصرف در هر برش استفاده شد و در فاصله ۲ برش مجزا محل اتصال تیغ با گزیلن و الکل ضد عفونی شد.

پارافین زدایی با۲ مرحله استخراج به وسیله گزیلن و متعاقب آن ۲ شستشو با اتانول ۱۰۰٪ انجام گرفت . مرحله آب دهی توسط الکلهای ۷۰٪ و ۵۰٪ به ترتیب انجام گرفت. بعد از سانتریفیوژ در دور بالا نمونه ها در با فر لیز کننده (متشکل از ۵۰۰mM تریس با PH=8.3 SDS نیم درصد , گلیکوژن حامل با غلظت 20µg/ml و پروتئیناز k با غلظت 20µg/ml) در درجه حرارت۵۶ درجه به مدت ۲۴ ساعت در حالت Shaking انکوبه شدند . سپس به هر میکروتیوپ حجم معادلی از فنل اضافه شده و سانتریفیوژ صورت گرفت. متعاقبا فاز مایع رویی با حجم معادلی از کلروفرم -ایزو آمیل الکل مخلوط شد و DNA با اضافه کردن ۰/۶حجم مایع رویی از ایزوپروپانول در حضور ۴۰ میکرو لیتراستات سدیم ۳ مو لار (PH=5.2) استخراج شد.DNA فوق برای شسته شدن نمک با اتانول ۷۰٪ شستشو شد . Pellet ها در هوا خشک شدند و مجددا در آب مقطر یاTE حل گشتند.

ب-۲ شناسائی DNA ویروسHPV :

در ابتدا تمامیت DNA استخراج شده و نبود مهار کننده های Taq DNA Polymerase به وسیله پرایمرهای اختصاصی ژن HFE مورد ارزیابی قرار گرفت . نمونه هائی که از نظر تکثیر ژن HFE منفی بودند از آنالیز حذف شدند . آزمایش Semi nested PCR با پرایمرهای اختصاصی برای HPV انجام گرفت. به طور خلاصه برای تکثیر ژن های ویروسی HPV نوع ۱۶و۱۸ از پرایمرهای مختص به نوع برای سکانس های منحصر به فرد نواحیE6 HPV-16 و HPV-18 (جدول شماره ۱) استفاده شد.

پلاسمیدهای ریکامبینانت حاوی DNA و نمونه های پاپیلوم انسانی انواع ۱۸-۱۶ به عنوان کنترل مثبت , نمونه های بدون DNA هدف به عنوان کنترل منفی برای مانیتور کردن آلودگی آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت .

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از با فر PCR ۱۰x , ۲ میلی مول کلرید منیزیم , ۲۰۰میکرو مول از هر یک از دزوکسی نوکلئوتید ها, ۱ واحد تک پلیمر از , ۲۰ میکرومول از هر پرایمر و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا ۲۰ نانوگرم از DNA HPV به عنوان کنترل مثبت انجام گرفت .

برای انجامPCR Semi nested ۱ میکرولیتر از محصولPCR به مخلوط PCR حاوی پرایمرهای

داخلی(جدول۱) اضافه شد . شرایط و پارامترهای ترموسایکلر در هر دو مرحله تکثیر PCR مشابه بود بعد از گرم کردن در ۹۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۳ دقیقه , مخلوط وارد ۳۰ سیکل تکثیر PCR(دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه , annealing در۵۶ درجه به مدت ۱ دقیقه , طویل سازی در ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه) شد. سیکل آخر با یک مرحله اضافه ۵ دقیقه ای طویل سازی در ۷۲ درجه ادامه یافت . محصولات تکثیر شده د ر آزمایش PCR به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ که با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود , بر روی دستگاه UV Transilluminator مشاهده و باندهای حاصل با مار کر مقایسه گردید.(شکل ۱تا ۴) .

یافته ها:

تعداد کلی نمونه های یافت شده در این دوره ۵ ساله ۵۱ مورد بود که شامل ۲۴مورد لارنژکتومی و۲۷ نمونه بیوپسی حنجره بود پس از بازبینی اسلایدهای موجود ۳۵ نمونه به دلیل داشتن تعداد کافی نسج تومورال انتخاب شدند و بقیه نمونه ها که بافت تومورال اندکی داشته ویا احتمال از بین رفتن آنها در جریان تحقیق وجود داشت از آنالیز حذف گردیدند. و در نهایت ۲ نمونه به دلیل آپلیفیکاسیون منفی برای ژن HFE از جریان مطالعه کنار گذاشته شدند. مطالعه بر روی تعداد نهائی ۳۳ بلوک پارافینی انجام شد که ۳۱ مورد آنها مرد و ۲ مورد آنها زن بودند و فاصله سنی ۳۷-۷۳ سال داشتند اطلاع درستی درباره محل آناتومیک بیوپسی ها , وضعیت سیگار کشیدن و مصرف الکل و....وجود نداشت.DNA ویروس پاپیلوم انسانی در ۵ مورد (۱۵٪) از ۳۳ نمونه کشف شد که شامل ۴ مورد (۱۲٪) HPV-16 و۱ مورد (۳٪) HPV-18 بود . هیچکدام از نمونه ها برای هر د و نوع مثبت نبودند. تمامی نمونه های منفی از نظر HPV با آپلیفیکاسیون قابل رویت ژن HFE را با PCR نشان دادند یعنی برای آنالیز مولکولی کافی و مناسب بودند (جدول۲) .

در ضمن تمامی نمونه ها از ابتدای برش تا مرحله آخر PCR دو بار مورد آنالیز قرار گرفتند وفقط نتایجی به عنوان مثبت پذیرفته شد که در هر دو مورد آنالیز نتیجه مثبت داشتند و مواردی که فقط یک بار مثبت شدند منفی قلمداد گشتند.

بحث:

بر تعداد مطالعاتی که نقش ویروس پاپیلوم انسانی را به عنوان یک کارسینوژن در سرطانهای انسانی مطرح می‌کنند افزوده می‌شود از جمله این سرطانها بدخیمی‌های حنجره می‌باشند که علاوه بر نقش ثابت شده سیگار و الکل در روند کارسینوژنز, جایگاه عوامل محیطی دیگر من جمله ویروس پاپیلوم انسانی مورد بحث و مجادله است (۱و۲و۳و۴و۷و۹) .

مطالعات مختلف نتایج ضد و نقیضی در مورد DNA این ویروس در ضایعات پیش سرطانی و بدخیمی حنجره نشان می‌دهند (۴و۷و۸و۱۲و۱۳و۱۶).

در هر حال کشف این ویروس در ضایعات مذکور از نقش احتمالی آن در ایجاد بدخیمی های این ارگان حمایت می‌نماید (۱و۲و۴). در این مطالعه در حدود ۱۵٪ از نمونه های سرطان سلول سنگفرشی حنجره , DNA ویروس پاپیلوم انسانی یافت گردید. مطالعات مشابه در ژاپن و ایتالیا که به ترتیب در سالهای ۱۹۹۸ - ۲۰۰۰ توسط Mineta H وVenoti A و همکارانش انجام شده است (۱۲و۱۴) همراهی بیشتری با HPV را نشان داده است از طرفی Lie ES و همکارانش در سال ۱۹۹۹ از نروژ آمار نزدیک تری از موارد مثبت (۸٪) را ارائه دادند (۱۳) . در ایران مطالعات انجام شده روی سرطانهای مری که در سال ۲۰۰۲ توسط Moradi A و همکارانش انجام شده همراهی این ویروس را به روش PCR معمول ۴۳/۷-۵۲/۸٪ گزارش کرده است . (۱۰) در حالیکه در گزارش Farjadian A و همکارانش در سال۲۰۰۲ درصد همراهی HPV با سرطان دهانه رحم با روش PCR معمول ۸۷,۱٪ بوده است(۱۱) .

مقایسه یافته های مطالعه حاضر با مطالعات ذکر شده در ایران شیوع بیشتر همراهی این ویروس در سرطانهای دو ارگان فوق نسبت به سرطان حنجره را نشان می‌دهد .

نظر به اینکه در مطالعه حاضر بعد از مرحله استخراج DNA PCR ژن HFE صورت گرفته است و تمام مواردی که از نظر آمپلیفیکاسیون ژن HFE مثبت بوده اند در مطالعه شرکت داده شده اند و از آنجا که PCR به روش Semi nested و با استفاده از ۲ پرایمر داخلی و خارجی انجام گرفته است و

مواردی مثبت تلقی شده اند که در ۲ نوبت مجزا نتـایج مثبتـی داشته اند لذا میتوان پیشنهاد نمود کـه اخـتلاف آمـار بدسـت آمده نسبت به مطالعـات خـارجی بـرروی حنجـره و همچنـین مطالعات همراهی ویروس با سرطانهای دهانـه رحـم و مـری در ایران حاکی از نقش کم رنگ تر ویروس پاپیلوم انسانی در ایجاد سرطان حنجره در بیماران ایرانی باشد . اگـر چـه تعمـیم ایـن پیشنهاد و اثبات آن مطالعات بیشتری در این زمینه را می‌طلبد. مقایسه مطالعات موجود در سرطانهای حنجـره در کـشور کوبـا (۴) اروپـا (۱۴و۱۳) , ژاپـن (۱۲) و بـا سـرطانهای حنجـره , سرویکس و مری در ایران حاکی از همراهـی بیـشتر HPV16 نسبت به HPV18 در سرطانهای مختلـف اسـت ونیـز از ایـن احتمال که فاکتور جغرافیائی یا نـژادی تـاثیر بـر نـوع ویـروس حنجره ندارد حمایت می‌کند .

نتیجه گیری و پیشنهادات:

همراهی ۱۵ درصدی نمونه های بررسی شده با ویروس پـاپیلوم انسانی دلالت بر این دارند که عفونت با انواع انکوژنیک ویروس و به ویژه نوع ۱۶ این ویـروس ممکـن اسـت در سینرژیـسم بـا عوامل خطر ساز دیگر شامل عوامل محیطی نظیر آلودگی هـوا, در معرض قرارگرفتن های شغلی , دود سـیگار و مـصرف الکـل و.....وبه احتمال کم تر به تنهائی در بروز سرطان حنجره نقش داشته باشند.

در نهایت مطالعاتی بر پایه هیبریداسیون در جا در کنـار PCR به دلیل اختصاصی تربودن ایـن روش و قابلیـت لوکولیزاسـیون ژنوم ویروس در سـلول تومـورال real Time quantitative PCR با قابلیت تعیین نسبیت ژنـوم ویـروس بـه ژنـوم سـلول میزبان و کنار گذاشتن موارد مثبت کاذب , مطالعـات Case-Case جهت مقایسه موارد سرطان حنجـره مثبـت ومنفـی از نظر ویروس پاپیلوم انسانی و از نظر سایر فاکتورهای خطر ونیـز مطالعـات Case –Control جهـت یـافتن جایگـاه ویـروس پاپیلوم انسانی در روند کـار سـینوژنز سـرطان حنجـره توصـیه می‌شود .

تشکر وقدردانی:

مجری و همکاران این طرح وظیفه خود دانسته از اسـتاد عـالی قدر جناب آقای دکتر رخشان کـه بلـوک هـای بـافتی سـرطان حنجره را در اختیار گذاشتند و همچنین از پرسـنل بخـشهای بیولوژی مولکولی و پـاتولوژی بیمارسـتان مـسیح دانـشوری و بخش پاتولوژی بیمارستان لقمان و نیز مرکز تحقیقـات سـل و بیماریهای ریوی مسیح دانشوری که امکانات انجام این تحقیق را فراهم آوردند تشکر و قدردانی کنند .

REFERENCES:

1- Ronaldo H; HPV and cancer of the upper aerodigestive tract. J ournal of the national cancer Institute JNCI, 2003, No 31; 47-51.

2- Ramzis, cortan, vinary. Komar, Tucker collins, Robbins pathologic basis of disease, 1999, saunders, 311-312.

3- Giovanni Almadori, Gabriella cadoni, paola cattani et al, Human papilloma virus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal Squamous cell carcinoma, clinical cancer research, 2001 Dec, 7(12): 3988-3993.

4- Yodira soto, odalys valdes, mayra mune et al, detection of type 16 Human papilloma virus DNA in formalin fixed invasive squamous cells from laryngeal cancers by PCR, 1998 Jul/ Aug, Mem inst oswaldo cruz, 93(4): 439-440.

5- Roger A. Hubbard, Human papilloma virus testing methods, Archives of pathology and laboratory medicine, 2003 Feb, 127(8): 940-945.

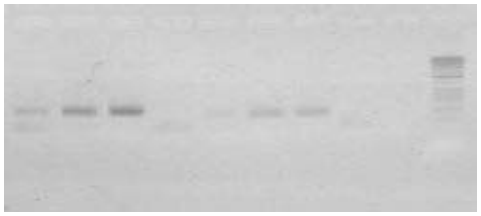
6- Patrick, Ha, sara I. Pai, william H. westra et al: Real Time quantitative PCR, demonstrates low prevalence of Human papilloma virus type 16 in premalignant and Malignant lesions of the oral cavity. Clinical cancer research, 2002 may, 8(5): 1203-1209.

7- syrjanen S, syrjanen K, mantyjarvi R et al, Human papilloma virus DNA in squamous cell carcinoma of the larynx demonstrated by in situ hybridization, ORL J otorhinolaryngol Relat spec. 1987, 49(4), 175-86.

8- Syrjanen K, Syrjanen S, pyrhonens, Human papillomavirus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas, ORL J otorhinolaryngol Relat spec, 1982, 44(6): 323-34.

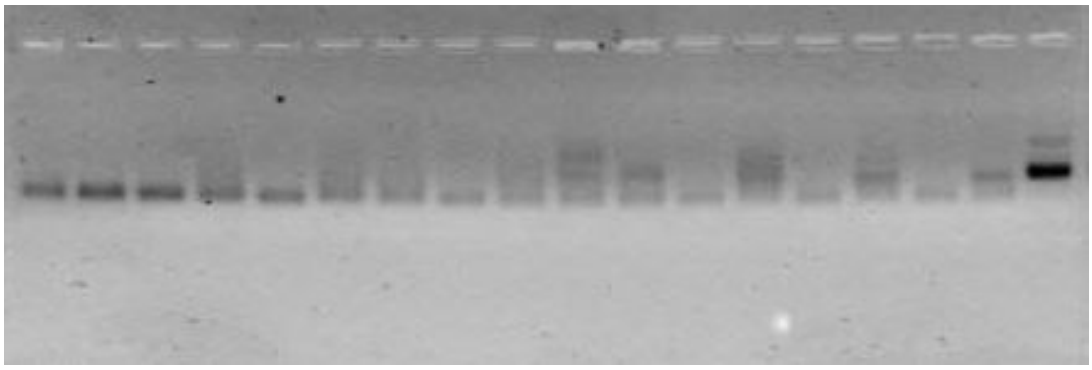
9- Arndt O, Brock J, kundt G et al, detection of Human papilloma virus DNA in formalin fixed invasive squamous cell carcinoma of larynx with PCR, laryngorhinotologie, 1994 oct, 73(10), 527-532.
10- Abdolvahab Moradi, Ethel Michele de villiers, Talat Mokhtari- Azad et al , detection of HPV DNA by PCR in esophageal Scc from Turkmen sahara, nourth- east of Iran, Biomed. J. 2002, 6(1): 19-23.
11-- Farjadian S, Asadi E, Doroudchi M, High risk HPV types in southern Iranian patients with cervical cancer, pathology oncology research, 2003, vol 9, no 2: 121-124.
12- Mineta H, oginot, Amano HM et al, Human papilloma virus Type 16 and 18 detection in head and neck squamous cell carcinoma, Anticancer Res, 1998 Nov-Dec; 18(613): 4765-8.
13- Lie ES, karisen F, Holm R et al, presence of Human papilloma virus in squamous cell laryngeal carcinoma. A study of 39 cases using PCR and in situ hybridization, Acta- otolaryngol 1998 Nov, 116(6): 900-5.
14- Venuti A, Manniv, Moreillo et al. physical state and expression of human papilloma virus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa, Med virol , 2000 Apr, 60(4): 396-402.
15- Czegledy J, major T, Juhasz A et al, Detection of Human papilloma virus gene sequenses in laryngea tumors and premalignant changes by polymerase chain reaction, orr Hetil. 1997 Jul, 27, 138(30): 1891-5.
16- Linderberg H, krogdahl A, laryngeal cancer and Human papilloma virus : HPV is absent in the majority of laryngeal carcinomas, cancer Lett, 1999 Nov, 146(1): 9-13.

1 2 3 NC 1 2 3

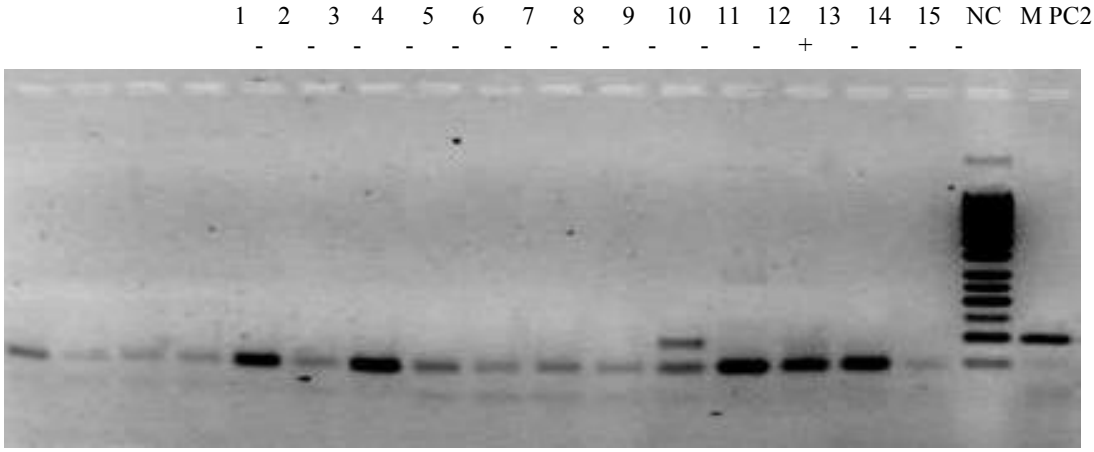


شکل(۱) نتایج الکترفورز پرایمر داخلی و خارجی اختصاصی برای HPV16 با استفاده از رقتهای مختلف کنترل مثبت

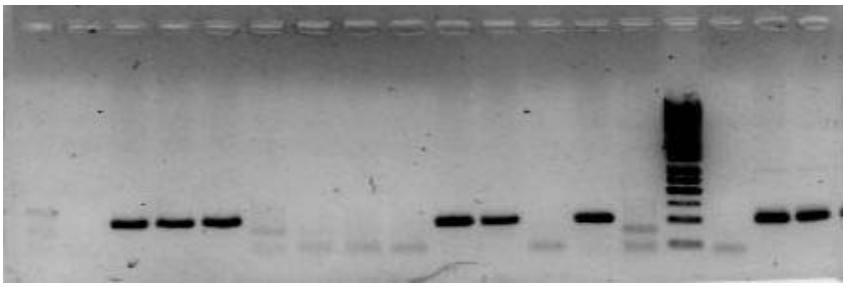
- - - - - - 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 NC PC1 PC
- - - + + - + - +



شکل (۲) نتایج الکتروفورز HPV-16 در نمونه های بلوکهای پارافینی به روش **semi nested PCR.**



شکل(۳) نتایج الکتروفورز HPV18 در نمونه های بلوکهای پارافینی به روش **semi nested PCR.**



شکل (۴) نتایج الکتروفورز به دست آمده برایHPV16,18 در نمونه های بلوکهای پارافینی در انجام روش برای بار دوم

نوع نمونه	HFE	HPV16	HPV18
لارنژکتومی توتال	+	–	–
بیوپسی حنجره	–	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	+
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی سوپراگلونیک	+	+	–
لارنژکتومی توتال	+	+	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	+	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
بیوپسی حنجره	–	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	–	+
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی سوپراگلوتیک	+	+	–
لارنژکتومی توتال	+	+	–
بیوپسی حنجره	+	–	–
لارنژکتومی توتال	+	+	–

نتایج PCR ژن HFE و ژن HPV نوع ۱۶و۱۸