

Pterijiyumda HPV varlığı ve p53 gen mutasyonu: PCR ve immünohistokimyasal çalışma

p53 mutation and the presence of the human papilloma virus in pterygium: PCR and immunohistochemical investigation

Nebil BAL¹, Figen DORAN¹, Fügen YARKIN², Özlem BAYRAMOĞLU², Seyhan VARİNLİ¹, İlter VARİNLİ³

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji¹, Mikrobiyoloji² ve Göz Hastalıkları³ Anabilim Dalları, ADANA

ÖZET

Pterijiyum, bulber konjunktivanın kornea merkezine doğru olan patolojik bir uzantısıdır. Etiyolojisinde fiziksel ve kimyasal ajanlar, p53 gen mutasyonu ve HPV gibi suçlanan pek çok ajan vardır. HPV, pterijiyumda ilk olarak 1994 yılında Varinli ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar, HPV'nin konjunktiva epitelinde p53 gen mutasyonuna neden olduğu ve bu mekanizma üzerinden oluşan kontrolsüz çoğalma sonucunda pterijiyumun meydana geldiğini düşünmektedir.

Bu çalışmada, primer ve tekrarlayıcı pterijiyumlarda p53 gen mutasyonu immünohistokimyasal yöntemle, HPV enfeksiyonu varlığı, HPV tip 16 ve 18 alt tiplerinden PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

p53 gen mutasyonu olguların 64'ünde (%88.8) (58 primer, 6 tekrarlayıcı) saptanmıştır. Yirmi altı primer ve 2 tekrarlayıcı olmak üzere toplam 28 pterijiyumda HPV (%38.9) tesbit edilmiş, dört olguda HPV-18, 8 olguda da HPV-16 alt tiplendirmesi yapılabilmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, pterijiyum etiolojisinde HPV ve p53 gen mutasyonunun önemli bir rolü olduğunu destekler niteliktedir. Etiyolojide var olan olası HPV enfeksiyonu nedeniyle, klinisyenler gelecekte ortaya çıkabilecek maligniteler ve tekrarlayıcı lezyonlar açısından hastaları yakın klinik takipte tutmalıdırlar.

Anahtar sözcükler: Human papilloma virüs, p53, PCR, pterijiyum

ABSTRACT

Pterygium is a pathological lesion of bulbar conjunctiva extending to the center of the cornea. There are a lot of agents that have been accused in etiology of pterygium, such as chemical and physical factors, human papilloma virus infection and p53 gene mutation. Human papilloma virus in pterygium was firstly demonstrated by Varinli et al in 1994. Researchers thought that human papilloma virus infection caused p53 gene mutation in the epithelium of conjunctiva and this damage led to uncontrolled cell proliferation which formed pterygium.

In this study, p53 mutation and the presence of the human papilloma virus infection in primary and recurrent pterygium were investigated. The p53 tumor suppressor gene mutation was demonstrated by immunohistochemistry, and presence of HPV infection, while HPV-16 and HPV-18 were investigated by polymerase chain reaction method.

The p53 tumor suppressor gene mutation was found in 64 (88.8%) of the samples (58 primary, and 6 recurrent pterygium). Human papilloma virus was found in 26 primary, and 2 recurrent pterygium cases (38.9%). Four human papilloma virus positive samples out of 28 were determined as HPV-18, and 8 as HPV-16.

Consequently, it has been assumed that HPV and p53 gene mutation play important roles in the etiopathogenesis of pterygium. Patients should be carefully followed-up for recurrences and developing malignancies secondary to human papilloma virus infection.

Key words: Human papilloma virus, p53, PCR, pterygium

Yazışma adresi: Dr. Nebil Bal, Başkent Üniversitesi, Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Patoloji Anabilim Dalı, 01250 Yüreğir-Adana

GİRİŞ

Bulber konjunktivanın patolojik uzantısı olarak tanımlanan piterijiyum, konjunktivanın nazal ya da temporal tarafından gelişen ve korneanın santral kısmına doğru ilerleme gösteren, üçgen şeklinde bir lezyondur. Piterijiyumda genellikle benign skuamöz epitelyum vardır. Ancak nadiren bu örtücü epitelde hafif derecede displaziden in situ karsinoma, hatta invaziv skuamöz hücreli karsinoma kadar farklı morfolojik değişiklikler izlenebilir (1-9).

Çok yavaş bir gelişim sürecine sahip olan piterijiyum, erken dönemde estetik bozukluğa, ileri dönemlerde görme kaybına neden olduğu için cerrahi olarak eksize edilir (1-3). Bu nedenle piterijiyumdan karsinom gelişmesi oranı oldukça düşüktür (6).

Piterijiyum etiyojisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmakta ve etiyojide çeşitli etkenler bildirilmektedir. Bu etkenler içerisinde en önemlisi ultraviyole ışınları (UV) olup diğer etkenler petrol ürünleri etkisinde uzun süre kalma, termal zedelenme, sigara içimi gibi kronik irritasyon, human papilloma virus (HPV) ve herpes simpleks virüs (HSV) gibi virüslerdir (1-12).

Son yıllarda yapılan çalışmalar piterijiyumda, konjunktiva epitelinde p53 gen ekspresyonunu artmış olarak tesbit etmiş ve piterijiyum gelişiminde yüzey epitelinde p53 mutasyonunun rolü olduğu fikrini ortaya atmıştır (4,9,10,13,14). p53 geninde mutasyona neden olabilecek ajanlar ultraviyole ışınları, radyasyon, çeşitli kimyasal maddeler ve bazı viruslardır (4,8,10,14).

Piterijiyumda HPV ilk defa 1994 yılında Varinli ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (6). Bunu izleyen yıllarda yapılan farklı çalışmalar ile piterijiyumda HPV varlığını gösteren farklı çalışmalar yer almıştır (7,9,15,16).

p53 geni üzerine olan mutajenik etkisi en iyi tanımlanan virus ise HPV'dir. HPV-16 ve HPV-18 alt tiplerinde bulunan E6 proteininin, p53 geninde mutasyona neden olarak karsinoge-

nezisin mekanizmasını başlattığı ya da tetiklediği farklı çalışmalar ile ortaya konmuştur (17-21).

Bu bilgiler desteğinde piterijiyum etiopatogeneze katkı sağlamak amacıyla, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda piterijiyum tanısı almış konjunktiva dokularında HPV varlığı ve p53 gen mutasyonunun araştırılması planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 1994-2001 yılları arasında tanı almış 72 piterijiyum olgusu ile kronik konjunktivit, kornea opasitesi, basit epitelyal kist, konjunktival nevüs, malign melanom ve retinoblastom nedeniyle eksize edilen 17 olgunun normal konjunktival doku örneği kontrol grubunu oluşturmak üzere çalışma kapsamına alındı. Nevüs ve tümör nedeniyle eksize edilen dokularda, örneklerin lezyonu içermemesi koşulu dikkatle göz önünde tutuldu.

Çalışma grubuna ait piterijiyum ve kontrol grubuna ait normal dokuların Hematoksilen-Eozin boyalı preparatları, ışık mikroskopunda yeniden incelendi.

Çalışma grubuna alınan olguların parafin bloklarından 5 mikron kalınlığında hazırlanan kesitlerine, Avidin-Biotin kompleks yöntemi ile p53 (Dako, mouse p53 protein clone DO-7, M7001) uygulandı.

Bu çalışmada p53 bağlanma özellikleri boyar madde olarak AEC kullanılmasından dolayı turuncu-kahverengi boyanış pozitif olarak kabul edildi. Pozitif boyanma paterni p53 için nükleer boyanma olarak değerlendirildi. Buna göre p53 uygulanmış kesitler incelenerek piterijiyum epitelinde %1-10 boyanma bir pozitif (+), %10-50 boyanma iki pozitif (++) ve %50'nin üzerinde boyanma üç pozitif (+++) olarak değerlendirildi.

Hematoksilen-Eozin boyalı preparatlar epitelde koilositoz, epitel altındaki stromada mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu ve epi-

telde normal, hafif, orta ya da ağır displazi şeklinde değerlendirildi.

Piterijyum dokusundan DNA'nın izolasyonu için parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında 8-10 kesit alınarak 1,5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarıldı. DNA izolasyonu sonrasında HPV konsensus çalışmasında "MY09 5' CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC 3' " ve "MY 11 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3' " (M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T) dizilimleri kullanıldı (46).

HPV-16 ve HPV-18 tip spesifik PCR protokolünde HPV tip 16 primerleri olarak "MYB 95 5'-GAT ATG GCA GCA CAT AAT GAC-3' " ve "MYB 133 5'-GTA ACA TCC CAG GCA ATT G-3' ", HPV tip 18 primerleri olarak da "WDB 74 5'-GGA TGC TGC ACC GGC TGA-3' " ve "MYB 130 5'-GGG CAA TAT GAT GCT ACC AAT-3' " DNA dizilimleri kullanıldı.

Amplifiye PCR ürünleri etidyum bromidle boyanmış %1.2'lik agaroz jelde elektroforez yapılarak analiz edildi ve 450 bp'lik bantları bulunduran örnekler HPV DNA varlığı yönünden pozitif kabul edildi.

Deney sonucunda agaroz jelde 260 bp'lik ürünler HPV 16 ve 250 bp'lik ürünler, HPV-18 için pozitif kabul edildi.

Verilerin istatistiksel analizinde, iki ordinal kategorize değişken arasındaki ilişkinin analizinde, ki-kare testi kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubuna alınan olguların 46'sı erkek (%63.9), 26'sı kadın (%36.1) idi. Olguların yaş ortalaması 52.88 ± 13.92 'di. 65 (%90.3) olgu primer, 7 olgu (%9.7) tekrarlayan piterijyumdu. Olguların 68'inde (%94.4) piterijyum epitelinde koilositoz görüldü. Bir olguda (%1.4) ağır displazi, iki olguda (%2.8) orta derecede displazi, 6 olguda (%8.3) hafif derecede displazi saptandı. Olguların 32'sinde (%44.4) piterijyum stromasında mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi. Kontrol grubunda, 8 olguda (%47.1) stromada mikst tipte iltihabi hücre infiltrasyonu izlendi ve bunların dördünde epitelde koilositoz vardı.

HPV, konsensus olguların 28'inde (26'sı primer, 2'si tekrarlayıcı piterijyum) (%38.9) bulundu. Kontrol grubunda ise HPV saptanmadı. Çalışma grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında piterijyum ile HPV arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.001$) (Tablo 1). HPV pozitif olguların 4 tanesi (%14.2) HPV-18, 8 tanesi (%28.4) HPV-16 olup kalan 16 olguda alt tiplendirme yapılamadı. Alt tiplendirme yapılabilen olguların tamamı primer piterijyumdu.

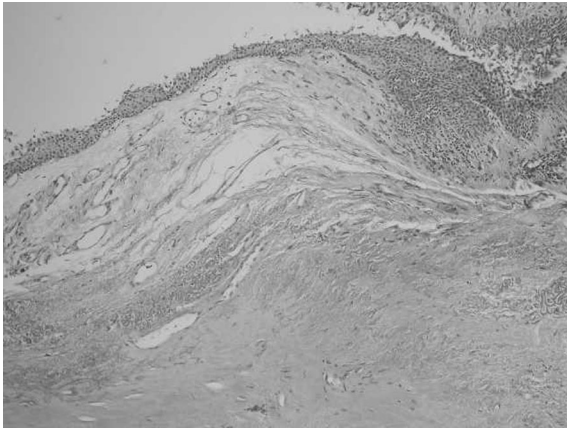
Hafif derecede displazi saptanan olguların yarısında, başka bir deyişle 6 hafif displazili piterijyum olgusunun 3'ü HPV pozitifdi. Orta ve ağır derecede displazi bulunan piterijyumlarda HPV bulunamadı. HPV pozitif olguların 27'sin-

Tablo 1. Primer ve rekürren piterijyum olguları ile kontrol grubunda human papilloma virus enfeksiyonunun dağılımı.

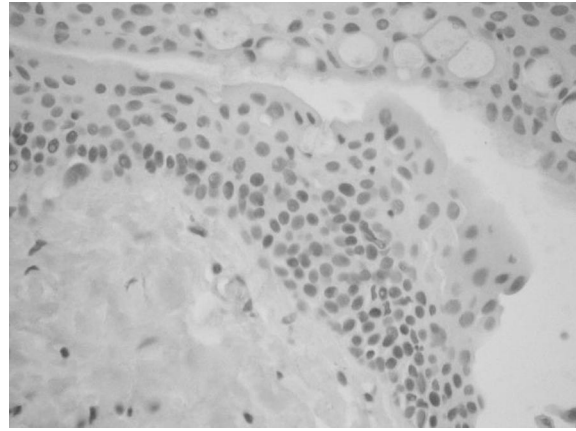
			PİTERİJYUM			
			Primer	Rekürren	Kontrol	Toplam
HPV	Negatif	Sayı	39	5	17	61
		HPV %	%63.9	%8.2	%27.9	%100.0
		Piterijyum %	%60.0	%71.4	%100.0	%68.5
HPV	Pozitif	Sayı	26	2		28
		HPV %	%92.9	%7.1		%100.0
		Piterijyum %	%40.0	%28.6		%31.5
Toplam		Sayı	65	7	17	89
		HPV %	%73.0	%7.9	%19.1	%100.0
		Piterijyum %	%100.0	%100.0	%100.0	%100.0

Tablo 2. Human papilloma virus pozitif ve negatif olgularda p53 gen mutasyonunun dağılımı.

			p53 MUTASYONU				Toplam
			-	+	++	+++	
HPV	Negatif	Sayı	7	8	16	13	44
		HPV %	%15,9	%18,2	%36,4	%29,5	%100,0
		p53 mutasyonu %	%87,5	%53,3	%61,5	%56,5	%61,1
HPV	Pozitif	Sayı	1	7	10	10	28
		HPV %	%3,6	%25,0	%35,7	%35,7	%100,0
		p53 mutasyonu %	%12,5	%46,7	%38,5	%43,5	%38,9
Toplam		Sayı	8	15	26	23	72
		HPV %	%11,1	%20,8	%36,1	%31,9	%100,0
		p53 mutasyonu %	%100,0	%100,0	%100,0	%100,0	%100,0



Resim 1. Stroma solar dejenerasyonunun belirgin olarak izlenildiği pterijiyumun histopatolojik görünümü (HE x100).



Resim 2. İmmünohistokimyasal olarak epitelde kahverengide nükleer boyanma ile kendini gösteren p53 gen mutasyonu (p53 x400).

de epitelde koilositoz, 15'inde stromal mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü.

Pterijiyum olgularının 64'ünde (%88,8) p53 gen mutasyonu pozitif bulundu; 23 olguda (%31,9) +++, 26 olguda (%36,1) ++, 15 olguda (%20,8) +. Kontrol grubu olgularının 13'ünde (%76,5) p53 mutasyonu negatif, bir olguda (%5,9) +++, bir olguda (%5,9) ++, iki olguda da (%11,7) + olarak saptandı. Pterijiyum ile kontrol grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında pterijiyum ile p53 gen mutasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p<0.001$).

HPV pozitif olguların birinde p53 gen mutasyonu negatif, 7 olguda +, 10 olguda ++, 10 olguda ise +++ olarak bulundu (Tablo 2).

TARTIŞMA

Pterijiyum bazı bulguları nedeniyle tümör benzeri özelliklere sahip olan, bulber konjunktivadan başlayarak korneanın merkezine doğru ilerleyen üçgen şeklinde bir lezyondur. Cerrahi tedavi sonrası hızlı bir şekilde tekrarlayıcı özellikte olabilmesi, neoplazi tedavisinde kullanılan geniş cerrahi eksizyon ile cerrahi sonrası radyoterapi veya kemoterapi kullanılıyor olması lezyonun tümör benzeri özellikleri arasında sayılabilir. Pterijiyumda, konjunktiva epitel daha çok benign nitelikte olup bazı olgularda hafiften ağır derecede displaziye kadar farklılaşmalar görülebilir (1-9). Nadir de olsa pterijiyum zemininde skuamöz hücreli karsinom gelişebilir. Ancak,

estetik ve görme bozukluğuna yol açan bu lezyonun erken eksize edilmesi nedeniyle karsinom gelişimi çok nadir görülmektedir (6). Stromada belirgin solar dejenerasyon en önemli bulgudur. Bunun yanında vasküler proliferasyon, inflamasyon, kanama da görülebilir (1-9).

Neden olan etiyolojik ajanlar arasında en önemlisi uzun süreli UV etkisidir. Bunun yanında etiyolojide termal veya kimyasal hasarlanma, sigara içimi gibi çevresel etmenler, virüsler (HPV, HSV), genetik veya immünolojik bozukluklar önemli rol oynamaktadır. Tip I immünolojik reaksiyona bağlı olarak stromada IgE birikimi piterijyum oluşumuna neden olabilir. Ek olarak kromozom 17p, 9p, 9q'de meydana gelebilecek heterozigozite kaybı ile giden bazı genetik bozukluklarda piterijyum gösterilmiştir (1-9,15,16,22).

HPV, piterijyumda ilk olarak Varinli ve arkadaşları (6) tarafından 1994 yılında yapılan immünohistokimyasal çalışmada gösterilmiştir. Bunu izleyen yıllarda immünohistokimyasal veya PCR yöntemleri kullanılarak piterijyumda HPV araştırılmıştır (7,9,15,16). HPV, papovavirüs ailesine üye olan çift sıralı DNA sarmalına sahip bir virüstür. Serviks uteri, anal bölge, yemek borusu, ürogenital sistem ve baş-boyun tümörlerinin bir kısmında izole edilmiştir (9). 70'ten fazla alt tipi tanımlanmış olan HPV benign ve malign olmak üzere pek çok neoplastik gelişimde rol oynar. Tip 6 ve 11 daha çok benign, 16, 18 ise malign lezyonlara neden olmaktadır (6,7,9,15,16,23,24). Papillom, piterijyum, göz kapağının, göz yaşı kanalının, konjunktivanın displastik lezyonları ve karsinomlarında özellikle tip 16 ve 18 bulunmuştur. Malign transformasyondan virus DNA'sında bulunan E6 ve E7 proteinleri sorumludur. E6 ve E7 proteinleri, konakçı DNA'sında bulunan nükleer proteinleri (p53 ve Rb genleri) etkilemekte ve bunları inaktif hale getirmektedir (6,7,9,17,23-28). Bunun yanında yapılan iki farklı çalışmada piterijyumda HSV enfeksiyonu varlığı gösterilmiştir (7,29).

p53 proteini, 17. kromozomun kısa kolun-

da yerleşmiş olan bir tümör baskılayıcı genidir. p53 geni, DNA'sı hasar görmüş olan hücrenin mitozda S fazına girmesini engeller ve proliferasyonunu durdurur. Bu dönemde hücre DNA'sı DNA tamir genleri tarafından tamir edilir ise proliferasyona devam eder, aksi takdirde p53'e bağlı olan programlı hücre ölümü mekanizması yolu ile ortadan kaldırılır. p53 geninin bu fonksiyonu UV, bazı kimyasallar, radyasyon, virüsler (özellikle HPV E6 proteini) ve farklı çevresel etkenler ile inaktive edilebilir (4,8,10,13,14,19,21,28). Bu genin inaktif hale gelmesiyle beraber, DNA'sı hasarlanmış olan hücre tamir edilemeksizin bu şekilde çoğalmaya devam edecek ve sonuçta neoplastik gelişimler ortaya çıkacaktır. Farklı çalışmalarda piterijyum epitelinde p53 gen mutasyonunun gösterilmesi, lezyonun gelişiminde bu basamağın rolü konusunda bizlere ışık tutmaktadır (4,8,10,13,14,17,18).

Çalışmamızda 72 olgunun 28'inde HPV saptanmıştır. Alt tiplendirmede bunlardan 4'ünün tip 18, 8'inin ise tip 16 olduğu saptanmış ve 16 olguda alt tiplendirme yapılamamıştır. Yine piterijyum olgularının 64'ünde, p53 gen mutasyonu daha çok epitelin bazal tabakasında ağırlıklı olmak üzere farklı yoğunluklarda pozitif saptanmıştır. HPV pozitif olguların (n=28) birinde, HPV negatif olguların da (n=44) yalnızca 7'sinde p53 gen mutasyonu saptanamamıştır. İstatistiksel analizlerde p53 gen mutasyonu ve HPV enfeksiyonu ile piterijyum arasında, yine HPV ve p53 gen mutasyonu arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır.

HPV pozitif ile negatif olguların büyük çoğunluğunda p53 gen mutasyonunun bulunması piterijyum gelişiminde anahtar rolün bu gene ait olduğunu ve farklı etiyolojik ajanların bu ortak nokta üzerinde etkilerini gösterdiklerini düşündürmektedir. p53 gen mutasyonunun pek çok neoplastik gelişimin ilk basamağını oluşturması nedeniyle, bulgularımızın piterijyumun preneoplastik bir lezyon olduğunu desteklediğini söyleyebiliriz.

Gözün interpalpebral alanı güneş ışığına bağlı hasarın en fazla olduğu alandır ki bu alan-

da epitelin daha çok bazal tabakası zedelenir. Pterijiyum ve limbal tümörlerin pek çoğu da bu alandan gelişmektedir. Hasar gören hücrelerin virüsler tarafından enfekte edilmesi de daha kolaydır (4). Çalışmamızda da p53 gen mutasyonunun daha çok bazal tabakada görülmesi bu bilgiyi destekler niteliktedir.

HPV'nin neden olduğu enfeksiyonlar sporadik enfeksiyonlardır ve HPV'nin konjunktiva-ya hangi yollarla geldiği bilinmemektedir. Muh-temel bulaşma yollarından biri genital HPV enfeksiyonu bulunan hastaların elleri ile virüsü gözlerine taşımaları olabilir (31). HPV pozitif olguların tedavilerine, rekürrensleri önlemek amacıyla antiviral tedavi eklenmelidir (9). Konjunktival sürüntülerin sitopatolojik incelemele-rinin, özellikle HPV pozitif olguları tanımlama-da önemli bir role sahip oldukları bildirilmiştir. Konjunktival sürüntü sitolojilerinde epitel hü-crerinde özellikle koilositotik değişikliklerin görülmesi öncelikle HPV enfeksiyonunun varlı-ğını düşündürmelidir ve tedavi buna yönelik tedbirler alınarak yönlendirilmelidir (6,7,9, 26,30).

Viral enfeksiyonun histopatolojik bir bul-gusu olan koilositozun 68 olguda pozitif olması, etiolojide farklı virüslerin de bulunabileceğine işaret etmektedir.

HPV pozitif olgularda saptanan displazi ve hiperplazi nedeniyle, bu tip olgular konjunktival tümör gelişim riski açısından düzenli konjunktival sürüntü sitolojisi takibine alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Spencer WH. Ophthalmic Pathology. An Atlas and Textbook, 4th ed., Saunders Co, Philadelphia, 1996. p.38-44.
2. Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology. 8th ed., Mosby, New York, 1996. p.2467.
3. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th ed., W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1999. p.1361.
4. Dushku N, Reid TW. p53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia and limbal tumors. Curr Eye Res 1997;16:1179-1192.
5. Ersöz C, Varinli S, Varinli İ, Ersöz TH. Pterygium patogenezi: İmmünohistokimyasal bir çalışma. T Oft Gaz 1990;20:231-234.
6. Varinli S, Varinli İ, Erkisi MK, Doran F. Human Papil-lomavirus in pterygium. Cent Afr J Med 1994;40:24-26.
7. Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of Herpes simplex virus and Human papillomavirus in ophthalmic pterygium. Cornea 2001;20:164-167.
8. Tan TH, Tang WY, Liu YP, Goh H, Smith DR. Apop-tosis and apoptosis related gen expression in normal conjunctiva and pterygium. Br J Ophthalmol 2000;84:212-216.
9. Gallagher MJ, Giannoudis A, Herrington CS, Hiscott P. Human papilloma virus in pterygium. Br J Ophthal-mol 2001;85:782-784.
10. Weinstein O, Rosenthal G, Zirkkin H, Monos T, Lifshitz T, Argov S. Overexpression of p53 tumor suppressor gen in pterygia. Eye 2002;16:619-621.
11. Twelker JD, Bailey IL, Mannis MJ, Satariano WA. Evaluating pterygium severity. Cornea 2000;19:292-296.
12. Saw S, Banerjee K, Tan D. Risk factors for the deve-lopment of pterygium in Singapore: A hospital-based case-control study. Acta Ophthalmol Scand 2000;78:216-220.
13. Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilisar M, Frucht-Pery J. Proliferative activity and p53 expression in pri-mary and recurrent pterygia. Ophthalmology 2001;108:985-988.
14. Tan TH, Arthur SM, Goh H, Smith DR. Abnormal ex-pression of the p53 tumor supressor gene in the con-junctiva of patients with pterygium. Am J Ophthalmol 1997;123:404-405.
15. Piras F, Moore PS, Ugalde J, Perra MT, Scarpa A, Si-rigu P. Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. Br J Ophthalmol 2003;87:864-866.
16. Sjo NC, Buchwald CV, Prause JU, Norrild B, Vinding T, Heegaard S. Human papillomavirus and pterygium. Is the virus a risk factor? Br J Ophthalmol (Serial on internet). (Cited 2006 Dec 19). Available from: <http://bj.o.bm.j.com/cgi/content/abstract/bjo.2006.108829v1>
17. Erol N, Yıldırım N, Dünder E, Yurdakul S. Konjunktival intraepitelyal ve invaziv yassı hücreli kanserlerin etyolojisinde human papillomavirüs ve p53 gen ilişki-si. MN Oftalmoloji 2002;9:188-191.
18. Dushku N, Hatcher LS, Albert DM, Reid TW. p53 ex-pression and relation to human papillomavirus infecti-on in pingueculae, pterygia, and limbal tumors. Arch Ophtalmol, 1999;117:1593-1599.
19. Louis G, John D, Wenig BL, Ferrer KT, Nodzenski E, Sabnani JB, et al. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:1230-1234.
20. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Prin-ciples and Practice of Oncology, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997. p.171-177.
21. Badaracco G, Venuti A, Bartolazzi A, Morello R, Mar-zetti F, Marcante ML. Overexpression of p53 and bcl-2 proteins and the presence of HPV infection are inde-pendent in head and neck cancer. J Oral Pathol Med 2000;29:173-179.
22. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunolo-

- gic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol* 1984;98:225-228.
23. Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumors of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1997;81:308-313.
24. McDonnell JM, McDonnell PJ, Stout WC, Martin J. Human papillomavirus DNA in a recurrent squamous carcinoma of the eyelid. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:1631-1634.
25. Lauer SA, Malter JS, Meier JR. Human papillomavirus type 18 in conjunctival intraepithelial neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1990;110:23-27.
26. Karcioğlu ZA, Issa TM. Human Papillomavirus in neoplastic and non-neoplastic conditions of the external eye. *Br J Ophthalmol* 1997;81:595-598.
27. Tabrizi SN, McCurrach FE, Drewe RH, Borg AJ, Garland SM, Taylor HR. Human papillomavirus in corneal and conjunctival carcinoma. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997;25:211-215.
28. Toth J, Karcioğlu ZA, Moshfeghi AA, Issa TM, Al-Ma'ani JR, Patel KV. The relationship between human papillomavirus and p53 gene in conjunctival squamous cell carcinoma. *Cornea* 2000;19:159-162.
29. Spandidos DA, Xinarianos B, Ergazaki M. The presence of herpes viruses in pterygium. *Int J Oncol* 1994;5:749-752.
30. Yagmur M, Ersoz C, Ersoz TR, Varinli S. Brush technique in ocular surface cytology. *Diagn Cytopathol* 1997;17:88-91.
31. McDonnell JM, Mayr AJ, Martin WJ. DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Eng J Med* 1989;320:1442-1445.