مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط کارسینوم سلول سنگفرشی پوست و عفونت ویروس پاپیلومای انسانی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره پلیمراز

دکتر مژگان مختاری* ، دکتر زهرا بیات**

دریافت : ۸۳/۱۲/۴ ، پذیرش : ۸۴/۷/۱۱

چکیده:

مقدمه و هدف: سرطان سلول سنگفرشی پوست یکی از سرطان های منشا گرفته از اپیدرم سطحی یا مخاط دهان یا ناحیه مقعدی تناسلی است. در تعدادی از مطالعات ارتباط این تومور با ویروس پاپیلومای انسانی ثابت شده است .با توجه به شیوع نسبتاً بالای کارسینوم سلول سنگفرشی پوست و رفتار تهاجمی و میزان عود بالای آن و احتمال متاستاز در صورت یافتن ارتباط معنی د ار بین ویروس پاپیلومای انسانی و کارسینوم سلول سنگفرشی پوست با استفاده از درمان آنتی ویرال می توان جهت درمان و جلوگیری از پیشرفت و عود و تهاجم این کانسر پوستی که هدف این مطالعه نیز می باشد راهکارهائی ارائه داد.

روش کار : در این مطالعه توصیفی ـ تحلیلی۶۶ بلوک پارافینی مربوط به ضایعات(SCC (Squamos Cell Carcinoma و بلوک های مربوط به حواشی سالم آنها جمع آوری گردید. بلوک ها برش داده شدند و با استفاده از کیت high pure product purification مبادرت به تخلیص DNA گردید ، سپس با استفاده از روش(PCR (Polymerase Chain Reaction سه مرحلهٔ chain extension , primer annealing , denaturating روی DNA انجام شد و محصول PCR را با استفاده از ژل آگارز در کنار کنترل + و - الکتروفورز کرده و حضور و یاعدم حضور باندها را بررسی کردیم.

نتایج : از ۶۶ مورد نمونه SCC ، ۱۳ مورد (۱۹/۷٪) ویروس(HPV (Human Papilloma Virus در ایشان مثبت بود و حاشیه ضایعه در ۲ مورد از نمونه ها که از نظر HPV مثبت بودند مثبت بدست آمد (۳٪ کل نمونه ها). از بین موارد HPV مثبت ۸۶/۷ درصد داخل ضایعه و ۱۳/۳ درصد حاشیه ضایعه بودند که با توجه به P.value=0.0003 ارتباط کاملاً معنی داری بین ابتلای به HPV و SCC یافت شد.

نتیجه نهائی : به نظر میرسد یافته های مطالعه حاضر ارتباط ویروس پاپیلومای انسانی با سرطان سلول سنگفرشی پوست را تأئید می کند بدین لحاظ ممکن است بررسی ویروس HPV در بیماران مبتلا به SCC و استفاده از درمان آنتی ویرال جهت درمان، جلوگیری از پیشرفت، عود و تهاجم این کانسر پوستی منطقی باشد .

کلید واژه ها : کارسینوم سلول سنگفرشی / واکنش زنجیره پلیمراز / ویروس پاپیلوم انسانی

مقدمه :

SCC(Squamous Cell Carcinoma) پوست یک نئوپلاسم بدخیم منشا گرفته از اپیدرم سطحی، مخاط دهان یا ناحیه مقعدی تناسلی است و بخاطر فقدان وابستگی استرومایی از اپی تلیومای سلول بازال متفاوت است. اکثریتSCC ها در نواحی که شدیداً تحت تأثیر نور خورشید قرار دارند روی میدهد . اغلب روی کراتوزهای اکتنیک از قبل موجود سوار میشود(۱،۲). افراد دارای پوست روشن با چشمان آبی و عدم توانایی در برنزه شدن پوست و افرادیکه بطور عادتی در معرض تشعشع قرار می گیرند بیشتر مبتلا شوند(۳). نسبت مرد به زن دو به یک و سن متوسط ابتلا برای مردان ۶۸ و در زنان ۷۲ سال است.

* استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (mokhtari@med.mui.ac.ir)
** دستیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

ما شاهد رشد سریعی در سن بالای ۶۵ سال هستیم که این گروه سنی در حال حاضر ۱۲٪ جمعیت عمومی را تشکیل میدهند(۱،۳). شایعترین علت SCC از میان عوامل محیطی نورخورشید است. اسکارهای زخمهای مزمن ، التهابات، سوختگی های قدیمی، سینوس های ناشی از استئومیلیت، تماسهای طولانی با هیدروکربورهای آلی مثل توتون، فوفل(betelnut) و آسیبهای ناشی ازحرارت ممکن است سبب کراتوز حرارتی و بدنبال آن SCC گردد (۲،۳) در تعدادی از مطالعات ویروس پاپیلومای انسانی بخصوص انواع ۱۶، ۱۸، ۳۰، ۳۳ همراه با SCC بوده است(۶-۴). این ویروس معمولاً به ژنوم سلول میزبان وارد شده و ورود DNA ویروس در تغییر شکل بدخیمی مهم است. محلی که DNA ویروس در طی فرایند داخل شدن ویروس قطع میشود، ثابت است و تقریباً همیشه در چهار چوب خواندن باز(open reading frame) E_1/E_2 در ژنوم ویروسی است E_2 ناحیه ای از ژنوم ویروسی است که رونویسی ژنهای E6 و E7 را سرکوب می کند سرطانزائی ویروسHPV وابسته به دو پروتئین است که توسط ژنهای E6 و E7 موجود در DNA ویروس کد می شوند وقتی ژن E2 در طی فرایند داخل شدن ویروس قطع شود ژن های E6,E7 بروز بیش از حد پیدا می کنند. پروتئین E6 به P53 متصل میشود و آن را سرکوب میکند E7 به پروتئین سرکوبگر توموری PRb متصل می شود. پس پروتئین E7 ، E6 از HPV دو پروتئین سرکوبگر توموری مهم که چرخه سلول را تنظیم می کنند از کار می اندازند(۱۰-۷ ،۵) طبقه بندی SCC بر اساس میزان سلولهای توموری در حال شاخی شدن و ضخامت تومور و عمق ضایعه در درم و درجه آیتپی سلولی و تعداد میتوز در هر HPF به انواع بدون دیفرانسیه، دیفرانسیه خوب، متوسط و ضعیف تقسیم میشوند (۳) این تومور قدرت تهاجم و متاستاز بالائی دارد . تهاجم به غدد لنفاوی موضعی گزارش شده است. پیدایش متاستاز بر حسب اینکه SCC در زمینه چه ضایعه ای قرار گرفته و محل ضایعه فرق میکند. مثلاً در ضایعات ناشی از آفتاب ۱٪ در کانسر لب تحتانی حدود ۲۰٪ است (۱،۲).

با توجه به شیوع بالای SCC خصوصاً در افراد مسن و قدرت تهاجم و عود متاستاز آن در صورت وجود ارتباط آن با HPV میتوان راهکارهایی جهت جلوگیری از تهاجم و عود آن ارائه داد. PCR یکی از روش های جدید سایتودیاگنوستیک است و چون اساس آن بر مبنای تکثیر ژنوم ویروس است با این روش از زمان های ابتدایی شروع آلودگی ویروس میتوان وجود ویروس را تشخیص داد. بعلاوه با این روش مقادیر بسیار اندک ویروس حتی یک کپی ـ نمونه(copy/sample) قابل شناسایی است. همچنین روشی سریع وحساس برای تشخیص میباشد(۶،۱۱). به همین منظور این مطالعه با هدف تعیین ارتباط کارسینوم سلول سنگفرشی پوست و عفونت ویروس پاپیلومای انسانی با استفاده از تکنیک PCR طراحی و اجرا گردید.

روش کار:

این مطالعه از نوع توصیفی ـ تحلیلی بوده و جمعیت مورد مطالعه بلوک های پارافینی مربوط به کانسر SCC و بلوکهای حواشی سالم نمونه های فوق در بیمارستانهای الزهرا و کاشانی شهر اصفهان میباشد. بلوکها باید دارای اطلاعات کامل مربوط به سن، محل ضایعه و گرید هیستوپاتولوژیک بیماری باشند. دراین مطالعه هر بلوک SCC باید دارای بلوک مربوط به حاشیه سالم هم باشد که از بلوک حاشیه سالم بعنوان شاهد استفاده میشود. تعداد کل بلوکهای SCC ، ۶۶ عدداست که همراه با بلوکهای حواشی سالم جمعاً ۱۳۲ بلوک میشود. نمونه ها را به آزمایشگاه ژنتیک برده و مراحل زیر به ترتیب رویشان انجام می گیرد :

۱- استخراج DNA ویروس از بلوک : ابتدا با میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون هر بلوک را برش داده و پارافین آن را در گزیلول حل می کنیم. سپس با استفاده از لایزیس بافر(Tissue lysis buffer) و آنزیم پروتئیناز K مبادرت به تخلیص DNA می کنیم. برای این منظور از کیت high pure PRC template preparation استفاده می کنیم. در کیت مذکور سلولها ابتدا درمعرض لیزوزیم و پس از لیزشدن در معرض پروتئیناز K و گوانیدین هیدروکلراید قرار می‌گیرند. این دو سریعاً نوکلئازها را غیر فعال میکنند. سپس بایندینگ بافر(binding buffer) به محتویات میکروتیوب اضافه و مخلوط می کنیم که منجر به رسوب و اتصال DNA به فیلتر فایبر گلاس در مرحله بعد می‌گردد. محتویات داخل لوله توسط پی پت استریل وارد فیلتر تیوب شده و هر فیلتر داخل یک کالکشن تیوب(collection tube) قرار داده میشود. هر فیلتر تیوپ حاوی دو لایه فایبر گلاس سفید رنگ در قسمت پائین خود است و انتهای آن مشبک است که این لایه ها بطور اختصاصی به DNA متصل می گردند. مجموع فیلتر تیوپ برای ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ میشود. DNA به فیلتر فایبرگلاس

متصل مانده و بقیه اجزای نمونه در کالکشن تیـوب جمـع میشوند سپس تیوپ را تعویض کرده وبافر inhibitor removal را داخل فیلتر تیوپ ریخته و مثل قبل سانتریفوژ در ۱ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm انجام میشود. با این عمل کلیـه مهارکننـده های PCR از DNA زدوده میشوند، پس از تعویض مجـدد کالکشن تیوب ، داخل فیلتر تیوپ واش بافر(wash buffer) می ریزیم و مثل قبل سانتریفوژ مـی‌کنـیم . بـا ایـن عمـل ناخالصـیها شسـته شـده و درون کالکشـن تیـوب جمـع میشوند. مجدداً محتویات کالکشن تیوب را کنار گذاشته و یکبار دیگر واش بافر را بروش قبل شستشو میدهیم . حال کالکشن تیوب را کنار گذاشته یک الوشـن بـافر (elution buffer) استریل برداشته و کالکشن تیوب را به فیلتر تیوپ اضافه میکنیم و پس از ۵ دقیقه به مدت ۱ دقیقـه بـا دور ۸۰۰۰rpm سـانتریفوژ مـی کنـیم. در ایـن مرحلـه DNA متصل بر فـایبرگلاس جـدا شـده و درون کالکشـن تیـوب جمع می شوند. عصارهٔ نهایی در ۱۵تا ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری میشود تا برای PCR استفاده شود.

۲- تعیـین کمـی DNA بـا اسـپکتروفوتومتر: oD نمونـه حاصـله را در طـول مـوج هـای ۲۶۰ و ۲۸۰ نـانومتر می سنجند اگـر oD 260/280 بـین ۱/۸ تـا ۲ بـود یعنـی میزان DNA استخراج شده مطلوب است.

۳- واکنش PCR : ابتدا مخلوط نمونه PCR که شامل بـافر مخصوص، پرایمر و آنزیم taq DNA پلی مراز است را تهیه کرده و ان را در لولـه هـای اسـتریل تقسـیم مـی کننـد و DNA تخلیص شده را به این لوله ها اضافه کرده ومخلـوط می کننـد و سـانتریفوژ انجـام میشـود. سـپس لولـه را در دسـتگاه ترمـال سـیکلر قـرار میدهنـد وبرنامـه کـار آن را بصورت زیر تنظیم میکنند.

Denaturating step 92° C 30"
Primer annealing 57° C 30"
Chain extension 72° C 1'

آنالیز محصول PCR بااسـتفاده از آگـارز الکتروفـورزیس و رنـگ آمیـزی بـا اتیـدیوم بروماید انجـام مـی شـود. علاوه بر تیوپهای حاوی نمونه های موردنظر ، کنترل + و - نیز در هرسری از PCR استفاده خواهد شد.

کلیه اطلاعات به دست آمده ثبت گردید و با اسـتفاده از نـرم افـزار SPSS و آزمونهـای آمـاری مجـذور کـای ، اسـپیرمن و اتـا مـورد تجزیـه و تحلیـل قـرار گرفت.

نتایج :

این مطالعه با بررسی ۶۶ نمونه از بلوکهـای پـارافینی مربوط به کانسر SCC و بلوک دارای حواشی سـالم انجـام شد میانگین سنی بیماران مورد بررسی برابر بـا ۹/۸۹±۶۷ سال با حـداکثر ۹۰ و حـداقل ۴۸ سـال محاسـبه گردیـد. ۱ نفر از بیماران مورد بررسی در گروه سنی زیـر ۵۰ سـال (۱/۵٪) ، ۱۸ نفـر در گـروه سـنی ۶۱-۵۰ سـال(۲۷/۳٪). ۲ نفر در گروه سنی ۷۰-۶۱ سال (درصد ۳۳/۳) و ۱۷ نفر در گروه سنی ۸۰-۷۱ سال (۲۵/۸٪) قرار داشتند . ۸ نفـر از بیماران نیز در گروه سنی بیش از ۸۰ سال قرار داشـتند (۱۲/۱٪). در ۴۱ نفراز بیمـاران (۶۲/۱٪) نمونـه از ضـایعه صورت و در ۲۵ نفر دیگر (۳۷/۹٪) نمونـه از سـایر نـواحی تهیه شده بود.

ازنظر گرید هیستوپاتولوژیک(histopathological grade) ضـایعه در ۵۳ مـورد (۸۰/۳٪) از نـوع دیفرانسـیه خـوب (well differentiated) در ۱۱ مورد(۱۶/۷٪) از نوع دیفرانسیه متوسط(moderately differentiated) و در ۲ مـورد از نـوع دیفرانسیه ضعیف(poorly differentiated)(۳٪)بود.

ویـروس HPV در ۱۳مـورد (۱۹/۷٪) از نمونـه هـای مورد بررسی یافت شد ، در حـالی کـه ۵۳ عـدد (۸۰/۳٪) ازنمونه ها فاقد ویروس HPV بودند. حاشیه ضایعه نیـز در ۲ مورد از نمونه ها از نظر HPV مثبت بود (۳٪) در حـالی که در ۶۴ نفر دیگر (۹۷٪) منفی بود.

از بین مـوارد HPV مثبـت ۸۶/۷ درصـد آنهـا داخـل ضایعه و ۱۳/۳ درصد آنها حاشیه ضایعه بودند که با توجـه به P.value=0.0003 ارتباط کاملاً معنی داری بین ابـتلای به HPV و SCC یافت می شود.

با توجه به مطالب فوق ارتباط SCC ویروس HPV بر اساس گروههای سنی مورد بررسی قرار گرفت در گروه زیر ۵۰ سال هیچ یک از موارد HPV(+) نبود. در گروه ۶۰-۵۰ سال ۲ نفر HPV(+) در گروه ۷۰-۶۱ سال ۶ نفر مثبـت و در گروه ۸۰-۷۱ سال ۳ نفر و در گروه بیش از ۸۰ سال ۲ نفر HPV مثبت بودند این اطلاعات با استفاده از نرم افـزار و آزمون آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفـت بـا توجـه به P=0.723 هیچ ارتباط معنی داری میان سن بیمـاران و وجود HPV(+) در ضایعه SCC بدست نیامد. از نظر گریـد هیسـتوپاتولوژیک ، ۱۱ نفـر از مـوارد HPV(+) از نـوع دیفرانسـیه خـوب ۲ مـورد از نـوع دیفرانسـیه متوسـط بودنـد. هیچ مـوردی از دیفرانسیه ضعیف HPV(+)

وجود نداشت که با توجه به P=0.847 ارتباط معنی داری میان گرید هیستوپاتولوژیک و مثبت شدن HPV در نمونه های SCC بدست نیامد.

۵ مورد از ضایعه های HPV مثبت در صورت و ۸ مورد آن در سایر نواحی دیده شد که با توجه به P=0.050 ارتباط معنی داری از نظر محل ضایعه و مثبت شدن HPV در ضایعه بدست نیامد.

با استفاده از آزمون آماری ارتباط میان گرید هیستوپاتولوژیک و HPV مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به P=0.632 ارتباط خطی میان این دو وجود نداشت هرچند ضریب همبستگی میان گرید و (+) HPV برابر با ۰/۰۵۹ محاسبه گردید.

ارتباط بین سن و آلودگی باHPV نیز مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از آزمون آماری رابطه میان این دومتغیر تعیین شد که ضریب همبستگی میان آن دو برابر با ۰/۰۳۹ محاسبه شد اما ارتباط خطی میان این دو وجود نداشت.

در مورد وجود HPV در حواشی سالم ضایعه تنها در ۲ مورد از نمونه ها HPV مثبت گزارش گردید که هر دو نوع از نوع دیفرانسیه خوب بودند(P=0.847) و هر دو مورد در سایر نواحی غیر از صورت قرار داشتند و لذا از نظر آماری ارزش قابل توجهی نداشتند(P=0.050).

بحث:

SCC پوست یکی از تومورهایی است که در اکثر موارد در رابطه با سرطان های محیطی است. در بین این عوامل نورخورشید در درجه اول اهمیت است. از میان عوامل محیطی در بسیاری از مطالعات به نقش ویروس HPV خصوصاً انواع ۱۶، ۱۸ ، ۲۰ و ۳۳ اشاره شده است(۳،۵،۸). در مطالعه در سال ۱۹۹۱ روی ۴۷ مورد کانسر غیر ملانومی پوست ۲۱ مورد SCC و۱۶ مورد BCC برای HPV با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه HPV تیپ ۱۶ در ۴ مورد ازSCCها (۱۹٪) و در سه مورد از BCC ها(۱۹٪) مثبت بدست آمد در تمام ۷ مورد مثبت شده از لحاظ ویروس HPV حواشی ضایعه فاقدHPV بود(۵). درمطالعه دیگری در سال۱۹۹۶ در کشور آلمان ویروس HPV را در کانسرهای پوستی غیر ملانومی بین دو گروه افراد پیوند کلیه و افرادی که ایمونوساپرس نبودند مورد بررسی قرار دادند. ۲۹ نمونه از ۱۹ فرد پیوند کلیه که شامل ۲۰ مورد SCC، ۵ مورد BCC و۴ مورد کارسینوم در جای پوست بود بررسی شد.۴۱ نمونه از ۳۲ نفر غیر ایمنوساپرس بدست آمد که۲۶ مورد SCC و ۱۱ مورد BCC و ۴ موردکراتوآکانتوم بودند این نمونه ها با تکنیک PCR از لحاظ HPV بررسی شد. در افراد پیوندی ۶۵٪ از ۲۰ نمونهSCC و۳ نمونه از۵ نمونه BCC، HPV مثبت شدند در افراد غیر ایمنوساپرس ۳۱٪ از ۲۰ مورد SCC و ۴ مورد(۳۶٪) از BCCها و ۲ مورد از کراتوآکانتوم ها مثبت شدند. در این مطالعه بعلت بالا بودن درصد HPV در کانسرهای پوستی آن را یک عامل اتیولوژیک جهت کانسرهای غیر ملانومی پوست در نظر گرفتند(۱۲). در مطالعه ای در سال ۲۰۰۱ درکشور آلمان انواع متعددی از تومور غیرملانومی پوست همراه با تعدادی پوست نرمال و فولیکول مو بررسی شد دراین مطالعه ۹۳٪ زگیل معمولی ، ۴۱٪ اکتنیک کراتوز، ۶۹٪ SCC، ۵۲٪ BCC، ۲۲٪ کراتوآکانتوما ، ۱۶٪ پوست نرمال و ۴۰٪ فولیکول مو از لحاظ HPV مثبت شد. در این مطالعه HPV خاصی بطور برجسته در تومورهای پوستی نتوانستند کشف کنند. بعلاوه بعلت پایین بودن تعداد ژنومهای ویروسی درBCC و SCC نتایج آنها چنین نشان داد که نقش HPV در ایجاد این کانسرهای پوستی هنوز مورد سئوال است. در مطالعات دیگریHPV DNA در ۱۵ تا ۳۰٪ بیوپسی های نرمال در بیمارانی که بیماری های مختلف پوستی داشتند به دست آمد در (NMSC(Nonmelamona Skin Cancer شیوع HPV ۳۰ تا ۸۰٪ بوده است. جهت بررسی HPV DNA در این مطالعه از PCR استفاده شد که حساسیت بسیار بالائی جهت دیتکت ژنوم ویروسی دارد(۸،۱۳). در مطالعه دیگری روی ۲۳ نمونه پوستی که شامل ۳ پوست نرمال ، ۳ مورد پسوریازیس ،دو مورد زگیل معمولی و دو مورد اکتنیک کراتوز و ۵ SCCدر جا ۳ کارسینوم بوون و ۷ موردSCC بودHPV DNA در تمام مواردا کتنیک کراتوز، SCC در جا، کارسینوم بوون وSCC مثبت شد در ۵۰٪ زگیل معمولی و ۶۶٪ پوست نرمال نتیجه نیز مثبت بود. هیچکدام از موارد پسوریازیس مثبت نشدند. این مسئله نشان دهنده نقش HPV درNMSC خصوصاً SCCاست. در موردSCC به نظر میرسد که تماس بااشعهUV یک ریسک فاکتور اصلی باشد و HPV نقش کوفاکتور را در جریان گسترش کانسر دارد(۱۴).

در این مطالعه ۶۶ بلوک SCC مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۱۳ مورد ضایعات (۱۹/۷٪) و ۲ مورد (۳٪) از حواشی ضایعات SCC از نظر HPV مثبت

بودند. از بین موارد HPV مثبت ۸۶/۷٪ آنها در خود ضایعه و ۱۳/۳٪ در حاشیه ضایعه بودند که بـا توجـه بـه ارزش P ارتباط بین HPV و SCCکاملاً معنی دار به نظر می رسد.

اکثر نمونه های پوسـتی در ایـن مطالعـه(حـدود ۸۰٪ آنها) از نوع دیفرانسیه خوب بودند که با توجـه بـه ارزشP ارتباط معنی داری بین گرید هیستوپاتولوژیک و بروز HPV بدست نیامد. بنابراین به نظـر نمـی رسـد کـه بـین گریـد هیستوپاتولوژیک و بروز HPV ارتباطی وجود داشته باشد.

شیوعSCC بیشتر در افراد بالای ۵۰ سال است در این مطالعه بیشتر افراد در گروه سنی ۶۱ تا ۷۰سال قرار داشتند که۳۳/۳٪ از جمعیت کلی را شامل میشد و بیشتر موارد HPV مثبت در این گروه سنی بود که۶ نفر از این افراد(۴۶/۱٪) از نظر HPV مثبت بودند. در مطالعه فوق با توجـه بـه ارزش P ارتباط معنی داری بین سن و HPV بدست نیامد.

SCC بیشتر در ناحیه تحـت تـأثیر نـور خورشـید رخ می دهد در مطالعه حاضـر ۶۲/۱٪ از ضـایعات پوسـتی در صورت وجود داشـت ولـی بیشـتر مـوارد HPV مثبـت در نواحی غیر صورت بود (۸۴/۶٪). با توجه به ارزش P ارتباط معنی داری بین HPV و محل ضایعه وجود نداشت.

نتیجه نهائی :

با توجه به ارتباط معنی دار بین HPV و SCC پوست و حواشی ضایعات SCC با انجام مطالعـات بیشـتر در ایـن زمینه احتمال آن هست که بتوان از داروهای آنتـی ویـرال علیه HPV جهت درمان و جلوگیری از عود و پیشرفت این تومور پوستی استفاده کرد.

منابع :

1. Mackie R.M. Epidermal skin tumors. In: Champion RH, Burton JL, Barns Da, (eds). Text book of dermatology. 8th ed. London: Blackwell ,1998:1672-1684.
2. Rosai J. Tumors and tumorlike conditions. In: Rosai and Ackerman's surgical pathology. 8th ed. Vol 1. St Louis: Mosby, 1996: 109-118.
3. Kirham N. Tumors & cysts of epidermis. In: Lever WF. Histopathology of the skin. Philadelphia. J.B. Lippincott 1997: 685-746.
4. Wieland U, Ritz Kowsky A, stoltidis M, Weissenborn S, Stark S, Ploner M, et al. Communication: Papilloma virus DNA in Basal cell carcinoma of immunocompetent Patients: an accidental association? J invest Dermatol 2000 : 115 (1):124-128.
5. Pierceal WE, Goidberg LH, Anathaswamy HN. Presence of human papiloma virus type 16 DNA sequence in human nonmelanoma skin cancers. J Invest Dermatol 1991; 97(5) : 880-884.
6. Kawashima M, Favre M, Obalek S , Jablonska S , Orth G. Premalignant lesions and cancers of the skin in the general population : evaluation of the role of human papilloma viruses. J Invests Dermatol 1990; 95(5): 537-42.
7. Eliezri YD, Silverstein SJ, Nuovo GJ. Occurrence of human papillomavirus type 16 DNA in cutaneous squamous and basal cell neoplasms. J Am Acad Dermatol 1990; 23: 826-42.
8. Meyer T, Arndt R, Christophers E, Nindl I, Stockfleth E. Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. Cancer Detects Prev 2001; 25(6): 533-47.
9. Strachan T. PCR, DNA sequencing and invitro mutagenesis. In: Strachan T , Read AP. Human molerular Genetics. USA. Blos scientific puplishers LTD , 1999: 119-137.
10. Lowy DP, Howley PM. Papilloma viruses. In: Knipe DM, Howley PM(eds). Fields virology. 4th ed. New York : Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 2238-2257.
11. Brown DW. The current role of PCR diagnostic & public health virology. In: Clewley JP. Polymerase chain reaction (PCR) for human viral diagnosis. London: CRC , 1995:13-23.
12. Shamanin V, Zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM, Hamm H, et al. Human papilloma virus infection in nonmelanoma skin cancer from renal transplant recipients & nonimmucompromise patients. J Not Cancer In st 1996; 83 (12): 802-11.
13. Berklnout RJ, Bouwes JN, Ter Schegget J. Presence of Human Papillomavirus DNA in benign and premalignant skin lesions from renal transplant recipients. J Clin Microbiol 2000; 38: 2087- 96.
14. Nindl I, Meyer T, Schmook T, Ulrich C, Ridder R, Audring H, et al. Human papillomavirus and overexpression of P16 ^{ink4a} in nonmelanoma skin cancer. J Dermatol Surg 2004;30(3):409- 414.