

## PUVA Tedavisi Alan Psoriasis Hastalarında (Deri Tipi: I-III) Ki-67, bcl-2 ve p53 Protein Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi

Emel Bülbül Başkan\*, Şükran Tunalı\*, Hayriye Sarıcaoğlu\*,  
Şaduman Balaban Adım\*\*

\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı

\*\* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

### Özet

Psoriasis tedavisinde sıklıkla kullanılan psoralen ve Ultraviole A (PUVA), DNA hasarı yaparak hücre ölümüne sebep olur. Bu çalışmanın amacı apoptotik ve antiapoptotik genlerin ekspresyonunda değişiklik yapan minimum UVA dozunu belirlemektir. İlk PUVA tedavisinden önce ve 24 saat sonra alınan psoriatik deri lezyonlarında avidin biotin kompleks immunperoksidaz metodu ile Ki-67, PCNA, p53 ve bcl-2 protein ekspresyonları incelendi.

Hastalar deri tiplerine göre gruplandırıldığında (her deri tipi için standart dozlar verildi) I. ve II. grupta tüm genlerin protein ekspresyonlarında azalma görülürken, III. grupta p53, PCNA, ve bcl-2 protein ekspresyonlarında artma saptanmıştır.

PUVA tedavisinin düşük dozlarda sadece keratinosit proliferasyonunu baskıladığı fakat 2.5-3.5 J/cm<sup>2</sup> arasındaki dozlarda apoptotik ve antiapoptotik gen ekspresyonlarında değişikliğe sebep olduğu izlenimini edindik.

**Anahtar Kelimeler:** Psoriasis, PUVA, p53, bcl-2, Ki-67, PCNA

Başkan EB, Tunalı Ş, Sarıcaoğlu H, Adım ŞB. PUVA tedavisi alan psoriasis hastalarında (Deri Tipi: I-III) Ki-67, bcl-2 ve p53 protein ekspresyonlarının immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. TÜRKDERM 2003; 37: 261-268

### Summary

**Background and design:** Psoralen plus ultraviolet A radiation (PUVA) is a frequently used therapy for psoriasis which leads to cell death by causing DNA damage. The purpose of this study was to determine the minimum UVA dose that induces changes in the expressions of apoptotic and antiapoptotic genes.

**Material-Methods:** Twenty-four patients with generalized psoriasis were enrolled into the study. The protein expressions of Ki-67, PCNA, p53 and bcl-2 were demonstrated in psoriatic skin sections before and 24 hours after first PUVA therapy course using the avidin-biotincomplex immunoperoxidase method.

**Results:** When the patients were grouped according to skin types (standard doses were given for each skin type), there was a decrease in the protein expressions of all genes in group I and II but an increase in the protein expressions of p53, PCNA and bcl-2 in group III.

**Conclusion:** It appears that PUVA treatment at low doses, only suppresses keratinocyte proliferation but a dose between 2.5 and 3.5 J/cm<sup>2</sup> induces changes in the expressions of apoptotic and anti-apoptotic genes.

**Key Words:** Psoriasis, PUVA, p53, bcl-2, Ki-67, PCNA

Başkan EB, Tunalı Ş, Sarıcaoğlu H, Adım ŞB. Evaluation of Ki-67, PCNA, bcl-2 and p53 protein expressions in PUVA-treated psoriasis patients (skin type: I-III) with immunohistochemical methods. TÜRKDERM 2003; 37: 261-268

Psoralen ve ultraviole A (PUVA) fotokemoterapisi psoriasisde etkili ve sık başvurulan bir tedavidir. Psoralenin DNA bazları ile etkileşerek UVA radyasyon altında bileşikler oluşmasının keratinositler üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır<sup>1,2</sup>. Bununla birlikte, son yıllarda PUVA tedavisinde keratinosit direnci ve psoriatik deride UVA

radyasyonuna duyarlı lenfositlerle ilgili çalışmalar PUVA'nin terapötik etkilerinin lenfotoksik yolla olduğunu düşündürmektedir<sup>3-10</sup>.

Tedavide kullanılan 8-metoksipsoralen ve UVA dozuna bağlı olarak hücrel stres cevabı değişmektedir<sup>11,12</sup>. Düşük dozlardaki DNA hasar onarımı için hücreler sitostatik ko-

**Alındığı Tarih:** 11.06.2003 **Kabul Tarihi:** 03.10.2003

**Yazışma Adresi:** Uzm.Dr. Emel Bülbül Başkan, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji AD, Görükle, 16059 Bursa  
Tel:0-224-442 81 44, Fax:0-224-442 92 28, e-mail: ezbaskan@ttnet.net.tr

Not: XVIII. Ulusal Dermatoloji Kongresi (26 Eylül-1 Ekim 2000, Antalya) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

numa geçerken, yüksek dozlarda oluşan DNA hasarı geçikmiş tip apoptozisi tetiklemektedir (>4 sa)<sup>2,11,12</sup>. Her iki mekanizma da genom gardiyanı veya tümör baskılayıcı gen olarak da bilinen p53 genine bağlıdır. Genotoksik stres altında p53 intraselüler olarak saptanabilir seviyelerde birikir ve hücreyi G1 fazında duraklatarak onarıma veya hücre ölüm yolunun açılmasına olanak sağlar. Çeşitli çalışmalarda solar UVA ve UVB radyasyonundan 24 saat sonra normal insan derisinde p53 ve PCNA ekspresyonlarının saptanması p53'ün hücre sel cevaptaki önemli rolünü desteklemektedir<sup>15-18</sup>. İmmunohistokimyasal olarak p53 ekspresyonunun, psoriatik deride keratinositlerin aşırı çoğalmasına bağlı olarak arttığı da bildirilmiştir<sup>19,20</sup>.

PCNA ve Ki-67, çoğalan hücrelerde tetiklenen ve hücre döngüsü ile ilişkili olan proteinlerdir. PCNA DNA sentezinde gerekli olan DNA polimeraz-delta'nın kofaktörüdür. Ayrıca, DNA eksizyon hasarının onarımında da rol alması UV radyasyon sonrası epidermal hücrelerde p53 ile birlikte PCNA ekspresyonunda da görülen artışı açıklamaktadır<sup>25</sup>. Psoriasisın patogenezinde keratinosit proliferasyonu yer aldığından psoriatik deride PCNA ve Ki-67 protein ekspresyonunun artmış olması beklenen bir sonuçtur<sup>19,26-31</sup>.

B hücre lösemi/lenfoma-2 (bcl-2) proteini mitokondria iç membranında bulunur ve hücre apoptozisini baskılayıcı etkisi vardır<sup>32</sup>. Bcl-2 protein ekspresyonu olgun T ve B hücrelerinde düşük bulunmakla birlikte aktivasyonla yükselmektedir<sup>33</sup>. Sağlıklı ve psoriatik deride bcl-2 protein ekspresyonuna nadiren rastlanırken, melanositlerde ve keratinosit kaynaklı tümörlerde artış gözlenmektedir<sup>34-36</sup>.

Hücre düzeyinde PUVA tedavisinin karsinogeneze yol açan mekanizmaları tam olarak aydınlanmadığı gibi bu tedavinin apoptotik ve antiapoptoik gen ekspresyonlarına etkisi ile ilgili çok fazla bilgi birikimi de yoktur. İmmunohistokimyasal çalışmamızın amacı, psoriatik deride, kullanılan UVA dozuna bağlı olarak p53, PCNA, Ki-67 ve bcl-2 protein ekspresyonlarındaki en erken değişiklikleri saptamaktır.

### Gereç ve Yöntem

Gerecimizi Aralık 1998-Aralık 1999 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Dermatoloji Polikliniğine başvuran generalize psoriasis tanısı konulan 13'ü

(%54.2) kadın, 11'i erkek (%45.8), toplam 24 hasta oluşturmaktadır. Hastaların yaşları 23 ile 69 (ortalama 42.6) arasında, hastalık süreleri 2 yıl ile 40 yıl arasında değişmekteydi. Daha önceden hiç yapay ultraviyole radyasyon ve son iki ay öncesine kadar da topikal veya sistemik antipsoriatik tedavi almamış hastalar çalışmaya dahil edildi. PUVA tedavisi için kontraendikasyon taşıyan hastalar çalışmaya alınmadı. Tüm hastalardan yazılı onay alındı.

PUVA tedavisi öncesi; hastaların infiltrate plaklarından, lokal anestezi altında alınan 5 mm.çaplı punch biyopsilerin hematoksilin&eozin boyama ile histopatolojik incelenmesi sonucu psoriasis tanısı onaylandı. Oral 8-MOP (0,6 mg/kg) ile beraber PUVA tedavisi PUVA kabini kullanılarak (Spectra 311/350; Davlin, U.S.A.) haftada üç kez uygulandı. Başlangıç dozu Fitzpatrick deri tipine göre hesaplandı. Deri tipi I olan hastalar başlangıç dozu olarak 1.5 J/cm<sup>2</sup>, II olan hastalar 2.5 J/cm<sup>2</sup> ve III olan hastalar 3.5 J/cm<sup>2</sup> UVA ışını aldı. Olgular tedaviden ortalama iki saat önce, oral olarak, 0.6 mg/kg, 8-MOP aldı. PUVA tedavisi sonrasında en erken değişikliklerin ilk seanstan sonraki 24 saat içinde başlaması nedeniyle olguların punch biyopsileri; aynı plaktan olmak üzere, ilk seanstan 24 saat sonra tekrarlandı.

### İmmunohistokimyasal boyama

Preparatlar, Uludağ Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında hazırlanıp incelenmiştir. PUVA tedavisi öncesi ve ilk seanstan 24 saat sonra alınan punch biyopsi kesitlerinde PCNA, Ki-67, bcl-2 ve p53 protein ekspresyonları avidin-biotin kompleks immunperoksidaz metodu ile gösterilmiştir (DAKO Corporation, U.S.A.).

PCNA, Ki-67 ve p53 immunohistokimyasal boyamaları için rastgele seçilmiş dört ardışık epidermal alanda oftalmik mikrometre yardımı ile 1000 keratinosit sayılarak bunların içinde pozitif nükleer boyanma gösteren hücrelerin yüzde oranları alındı. Bcl-2 boyaması için ise, en yoğun boyanma gösteren dört dermal alanda, yine oftalmik mikrometre yardımı ile, pozitif boyanan T hücreleri sayılarak ortalaması alındı.

### Bulgular

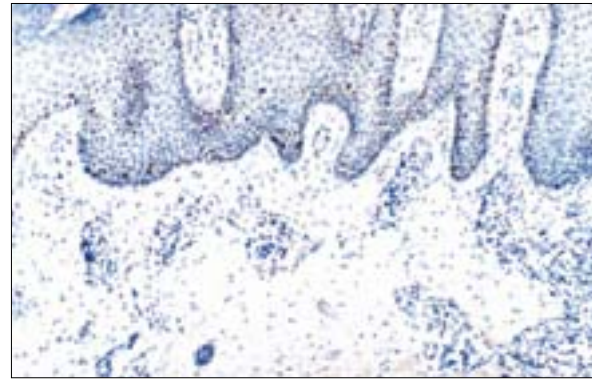
PUVA tedavisi alan hastaların dokuzunun (4 kadın, 5 erkek) deri tipi I, sekizinin (3 kadın, 5 erkek) deri ti-

pi II ve yedisinin (6 kadın, 1 erkek) deri tipi III idi. İlk seans UVA dozları deri tipine göre verildiği için hastalar, deri tiplerine göre üç gruba ayrıldı. Her üç grupta kadın ve erkek dağılımı Ki-kare test sonuçlarına göre homojenlik göstermekte idi.

PUVA tedavisinin ilk seansı öncesi ve 24 saat sonrası lezyon yerinden alınan punch biyopsilerinin, Ki-67, PCNA ve p53 immunohistokimyasal boyamaları ile incelemesinde, pozitif nükleer boyanma gösteren hücreler daha çok epidermisin bazal ve suprabazal tabakalarında gözlemlendi.

Tüm immunohistokimyasal boyanmalar için öncesi-ne göre yüzde değişimi (YD), PUVA sonrası hücre sayısından PUVA öncesi hücre sayısı çıkarıp PUVA öncesi hücre sayısına bölünerek hesaplandı.

Ki-67 immunohistokimyasal incelemede 24 hastanın 14'ünde (%58.33) pozitif nükleer boyanma gösteren hücre sayısında azalma, dokuzunda artış saptanırken (%37.5) birinde (%4.17) değişiklik gözlemedi. PUVA öncesi ortalama boyanan hücre sayısı % 38.19, PUVA sonrası ortalama boyanan hücre sayısı % 32.22 idi. Wilcoxon Signed Ranks Test sonucuna göre her üç deri tipinde de PUVA öncesi ve sonrasında Ki-67 pozitif boyanan hücre sayısında anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo- I). Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney testleri ile tedavi öncesi ve sonrasında yüzde değişimleri karşılaştırıldı (Tablo II). Gruplar içindeki Ki-67, PCNA, bcl-2 ve p53 boyanma yüzde değişim ilişkileri ise Pearson korrelasyon katsayısı ile araştırıldı. Deri tipi I için PCNA yüzde değişimi ile aynı yönde %70'lik bir etkile-



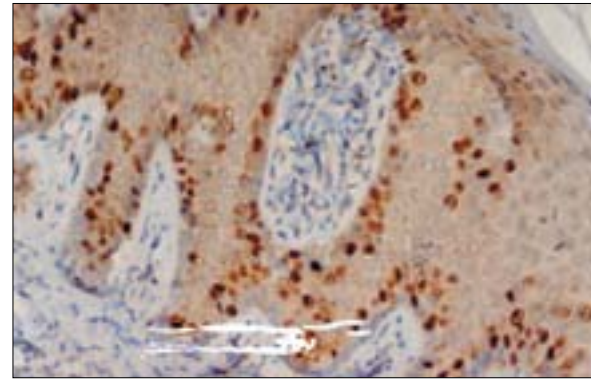
Şekil 1a: PUVA tedavi öncesi p53 immunboyanma gösteren keratinositler (x 100 büyütme).

şim olduğu ( $p < 0.05$ ), deri tipi II için bcl-2 yüzde değişimi ile aynı yönde %77'lik bir etkileşim olduğu ( $p < 0.05$ ) saptandı. Deri tipi III için böyle bir ilişki tespit edilmedi.

PCNA immunohistokimyasal incelemede 24 hastanın 18'inde (%75) pozitif nükleer boyanma gösteren hücre sayısında azalma, 6'sında (%25) artış saptandı. PUVA öncesi ortalama boyanan hücre sayısı % 49.58, PUVA sonrası ortalama boyanan hücre sayısı %44.80 idi. Deri tipi I için PUVA öncesi ve sonrasında PCNA pozitif boyanan hücre sayısında anlamlı bir azalma bulundu ( $p < 0.05$ ). Yüzde değişimine bakıldığında yine deri tipi I için Ki-67 yüzde değişimi ile aynı yönde %70'lik bir etkileşim olduğu saptandı ( $p < 0.05$ ). Diğer deri tiplerinde böyle bir ilişki tespit edilmedi.

p53 immunohistokimyasal incelemede ise 24 hastanın 15'inde (%62.5) pozitif nükleer boyanma gösteren hücre sayısında artış, dokuzunda (%37.5) azalma saptandı. PUVA öncesi ortalama boyanan hücre sayısı % 11.5, PUVA sonrası ortalama boyanan hücre sayısı %12.0 idi. Deri tipi III için PUVA öncesi ve sonrasında p53 pozitif boyanan hücre sayısında anlamlı bir artış bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil: 1a, 1b). Diğer deri tiplerinde ve yüzde değişimlerinde anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Bcl-2 immunohistokimyasal incelemede 24 hastanın 11'inde pozitif nükleer boyanma gösteren hücre sayısında azalma (%45.83), 12'inde artış saptanırken (%50), birinde (%4.17) değişiklik tespit edilmedi. PUVA öncesi boyanan hücre ortalama sayısı 55.45, PUVA sonrası boyanan ortalama hücre sayısı 50.91



Şekil 1b: PUVA tedavi sonrası p53 immunboyanma gösteren keratinositler (x 400 büyütme).

idi. Deri tipi III için PUVA öncesi ve sonrasında bcl-2 pozitif boyanan hücre sayısında anlamlı bir artış bulundu ( $p<0.05$ ) (Şekil: 2a, 2b). Yüzde değişimine bakıldığında deri tipi I ile III arasında çok anlamlı ( $p<0.001$ ), deri tipi II ile III arasında anlamlı ( $p<0.05$ ) artış bulundu. Deri tipi II için Ki-67 yüzde değişimi ile bcl-2 yüzde değişiminin arasında aynı yönde %77.4'lük bir etkileşim olduğu ( $p<0.05$ ) saptandı. Diğer deri tipleri ile benzer bir etkileşim görülmedi.

### Tartışma

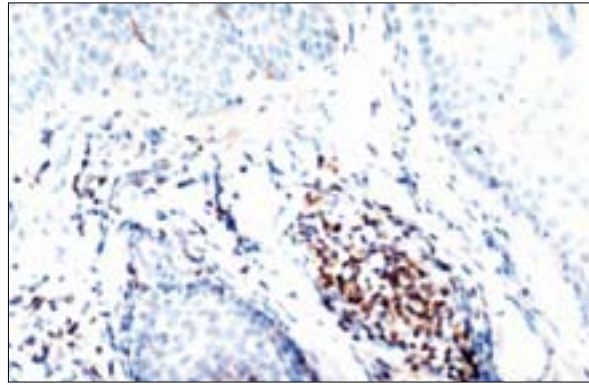
İlk olarak kullanıma girdiği 1974 yılından beri PUVA tedavisinin, başta psoriasis olmak üzere birçok dermatolojik hastalıkta etkinliği gösterilmiştir<sup>1,2</sup>. PUVA tedavisi sadece mitozu ve DNA sentezini değil aynı zamanda antijen sunan hücreleri ve bazı lenfositleri de baskılamaktadır. Son dekatta yapılan çalışmalarda UV kaynaklı apoptozise keratinositlere nazaran T hücrelerinin daha duyarlı olduğu bildirilmiştir<sup>1,4,10</sup>. Günümüzde psoriasis, T hücre-keratinosit düzeyinde bilinmeyen bir bozukluğa bağlı olarak apoptozise direnç gösteren keratinositlerin aşırı çoğalması ile karakterize bir hastalık olarak düşünülmektedir<sup>5,37,38</sup>. Buradan yola çıkarak gerek psoriasisın patogenezi gerekse PUVA tedavisinin etki mekanizmasında apoptotik ve antiapoptotik genlerin rol oynayabileceği varsayılabilir.

Tüm memeli hücrelerin nukleusunda bulunan p53 geni, UV radyasyona ikincil olarak gelişen genotoksik hasar karşısında hücreleri G1 fazında duraksatarak onarımı veya ölüme geçişi için zaman tanır ve böylece genomun bütünlüğünü korumaktadır<sup>39,40</sup>. Yarı ömrünün kısa olmasından dolayı normal hücre-

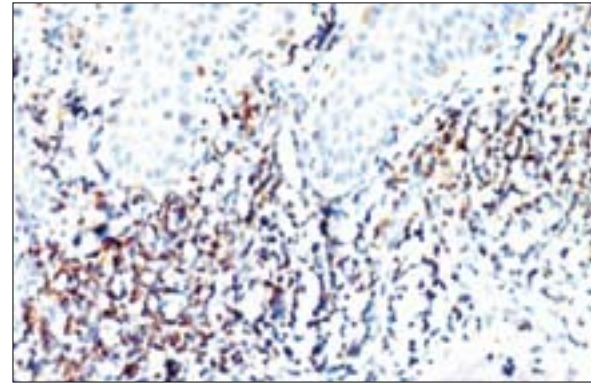
lerde p53 protein seviyesi immunhistokimyasal yöntemlerle saptanabilir düzeyin altındadır ancak p53 proteininin mutasyona uğraması veya ısı şok proteini veya diğer viral proteinlerle stabilize olması sonucunda bu yöntemlerle saptanabilir düzeye ulaşmaktadır<sup>41,42</sup>. p53 ekspresyonu, aşırı çoğalan hücrelerdeki olası DNA hatalarının onarmak ve malign transformasyonu önlemek için fizyolojik olarak da artabilir<sup>19,43,44</sup>.

Psoriatik deride p53 ekspresyonu ile ilgili çalışmalarda özellikle epidermisin bazal ve suprabazal tabakalarında, %0.3-20 arasında değişen oranlarda birikim bildirilmiştir<sup>19,20,43-45</sup>. Solar UVA ve UVB radyasyonu sonrası, DNA hasarının 24 saatte pik yapacak şekilde ve doza bağımlı olarak p53 ekspresyonunu tetiklediği gösterilmiştir<sup>12,15-18</sup>. Bizim çalışmamızda PUVA tedavisi öncesi ve tedaviden 24 saat sonrası ortalama p53 pozitif boyanan keratinosit yüzdesi sırasıyla 11.5 ve 12 idi (Tablo I).

PCNA ve Ki-67, hücrenin çoğalma döngüsü ile ilişkili olan ve dolayısıyla hücre çoğalma oranını gösteren belirteçlerdir<sup>21-24, 27,28,31</sup>. Keratinositlerin aşırı çoğalma gösterdiği psoriasisde Ki-67 ve PCNA ekspresyonları için birçok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda bildirilen oranlar yaklaşık %54'e ulaşmaktadır ve her iki protein de epidermisin bazal ve suprabazal tabakalarında gözlenmiştir<sup>19,24,27-29</sup>. PCNA, DNA sentez-eksizyon hasarında da rol oynadığından hücre döngüsünün diğer basamaklarında da rastlanmaktadır ve bu yüzden daha yüksek oranlarda saptanır. Biz de literatür ile uyumlu olarak PUVA tedavi öncesi PCNA pozitif boyanan hücre oranını %49.6



Şekil 2a: PUVA tedavi öncesi bcl-2 immunboyanma gösteren dermal lenfositler (x400 büyütme).



Şekil 2b: PUVA tedavi sonrası bcl-2 immunboyanma gösteren dermal lenfositler (x400 büyütme).

ve Ki-67 pozitif boyanan hücre oranını %38.2 olarak bulduk. Normal deri ile karşılaştırıldığında Ki-67 ve PCNA ekspresyonlarında görülen artış psoriasisdeki çoğalma aktivitesini yansıtmaktadır.

Bcl-2 kemoterapi, radyasyon ve ısı şoku gibi birçok uyararla tetiklenen ve apoptozisin etkin bir baskılayıcı

olan geniş bir protein ailesinin üyesidir. Bcl-2 hücre çoğalmasını uyarmaz fakat çoğalma döngüsünde olmayan hücrelerin canlılığının devamını destekler. Bcl-2 eksprese eden periferik T hücrelerinin S-fazına geçişinin geciktiği ve daha az IL-2 ürettiği bildirilmiştir<sup>46-48</sup>. Bcl-2 ile pozitif boyanma normal ve psoriatik epiderminin bazal tabakasında nadiren saptanırken

**Tablo I: Deri tiplerine göre ilk doz PUVA öncesi ve sonrası Ki-67, PCNA, p53 ortalama boyanma yüzdeleri ve bcl-2 pozitif lenfosit ortalama sayısı**

Deri tipi	Protein	n	M*	SS	M	SS	Anlamlılık
I	Ki-67	9	35.46	12.08	32.84	16.05	p>0.05
	PCNA	9	59.00	21.27	42.83	23.34	p<0.05
	p53	9	16.68	12.77	15.17	11.83	p>0.05
	bcl-2	9	70.66	52.27	44.47	16.13	p>0.05
II	Ki-67	8	36.95	5.28	34.18	12.96	p>0.05
	PCNA	8	48.65	16.41	35.16	14.01	p>0.05
	p53	8	10.30	5.83	9.77	6.89	p>0.05
	bcl-2	8	49.75	40.59	40.50	18.0	p>0.05
III	Ki-67	7	43.14	23.26	29.20	4.86	p>0.05
	PCNA	7	38.55	25.56	40.21	22.93	p>0.05
	p53	7	6.22	4.06	10.64	3.54	p<0.05
	bcl-2	7	42.42	19.22	70.71	25.68	p<0.05
Toplam	Ki-67	24	38.19	14.53	32.22	12.29	
	PCNA	24	49.58	21.95	39.51	19.93	
	p53	24	11.50	9.53	12.05	8.52	
	Bcl-2	24	55.45	41.25	50.91	23.08	

n:hasta sayısı, M\*:p53, Ki-67 ve PCNA yüzde ortalamaları ve bcl-2 ortalama sayısı, SS: standart sapma, D:Deri tipi.

**Tablo II: Deri tiplerine göre PUVA sonrası Ki-67, PCNA, p53 ve bcl-2 yüzde değişimleri**

		n	YD	SS	Anlamlılık
I	Ki-67	9	-0.0461	0.3461	p>0.05
	PCNA	9	-0.2574	0.2643	p>0.05
	p53	9	-0.1562	0.9101	p>0.05
	bcl-2	9	-0.2081	0.3195	p<0.05*
II	Ki-67	8	-0.0782	0.3031	p>0.05
	PCNA	8	-0.1990	0.4290	p>0.05
	p53	8	0.1706	0.7874	p>0.05
	bcl-2	8	-0.0257	0.4924	p<0.05*
III	Ki-67	7	-0.0782	0.3031	p>0.05
	PCNA	7	0.0915	0.4403	p>0.05
	p53	7	1.0024	0.8522	p>0.05
	bcl-2	7	0.7454	0.5491	p<0.05*

n:hasta sayısı, YD:yüzde değişimi, SS: Standart sapma,

\*Deri tipi I ve III arasındaki bcl-2 pozitif lenfositlerin ortalama sayısındaki yüzde değişimi çok anlamlı (p<0.001) ve deri tipi II ve III arasında ise anlamlı idi(p<0.05).

melanositlerde sıklıkla görülür<sup>36,48-51</sup>. Literatürde bahsedildiği gibi biz de çalışmamızda keratinositlerde nadir bcl-2 protein ekspresyonu gözledik. Epidermal ve dermal olgun T ve B lenfositleri de bcl-2 ekspresyonundan UVA radyasyon dozları ile bcl-2 pozitif boyanan lenfositlerin oranlarını karşılaştırmayı uygun gördük. Bcl-2 pozitif lenfositlerin ortalama sayılarında PUVA tedavi sonrasında genel bir düşüş görülmekle birlikte en belirgin azalma III. deri tipinde idi.

UVA radyasyon tetiklediği DNA hasarının mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarını uyaran minimum UVA dozu ile ilgili az sayıda literatür bulunmaktadır. 1996 yılında Johnson ve ark.<sup>4</sup> düşük dozlarda PUVA'nın fitohemaglutininle aktive olmuş normal lenfositler veya transforme T lenfositleri için sitotoksik olduğunu göstermiştir. Aynı yıl Vowels ve ark.<sup>9</sup> insan keratinosit kültürlerinde 24 saat içinde apoptozisi tetikleyen minimum UVA ve 8-MOP konsantrasyonunu sırasıyla 0.5 J/cm<sup>2</sup> ve 12.5 ng/mL olarak bildirmişlerdir. Daha yakın bir zamanda Hannuksela-Svahn ve ark. PUVA tedavi öncesi ve sonrasında p53 protein ekspresyonunu çalışmışlar fakat doz-cevap ilişkisini incelememişlerdir<sup>44</sup>.

Bükülmez ve ark.<sup>52</sup> çalışmalarında çeşitli nedenlerle PUVA tedavisi alan hastalarda p53 ve p21 protein ekspresyonunu incelemişler ve PUVA tedavisinin normal deride p53 ekspresyonunu arttırmadığı kanaatine varmışlardır. Şahin ve ark.<sup>53</sup> ise mycosis fungoides hastalarında PUVA tedavisinin apoptozis ve c-myc, p53, bcl-2 ve PCNA protein ekspresyonlarına olası etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bu tedavinin c-myc, bcl-2 ve PCNA ekspresyonlarını azalttığını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıkların farklı hastalıkların seçimi ve metodoloji ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz.

Çalışmamızda doz-cevap ilişkisini inceleyebilmek için deri tiplerine göre standart doz alan hastalar gruplandırılmıştır. Deri tipi I olan hastalar en düşük ilk doz (1.5 J/cm<sup>2</sup>) ve deri tipi III olan hastalar en yüksek ilk doz (3.5 J/cm<sup>2</sup>) almışlardır. I. ve II. gruptaki hastaların tüm gen protein ekspresyonlarında genel bir azalma gözlenmiş fakat III. grupta p53, PCNA ve bcl-2 protein ekspresyonlarında artış saptanmıştır. PUVA tedavi sonrasında görülen bu artış, I. grupta PCNA, III. grupta p53 ve bcl-2 açısından istatistiksel olarak anlamlı idi.

Tüm gruplarda Ki-67 protein ekspresyonundaki azalma olasılıkla hücre çoğalmasının baskılanması ile ilişkilidir. III.grupta görülen PCNA ve p53 ekspresyonlarında artış PUVA tedavisi ile ortaya çıkan DNA hasarına karşı fizyolojik bir reaksiyon olabilir. PUVA dozu sonrasında lenfositlerde gözlenen bcl-2 ekspresyonundaki yükselmenin apoptozisten kaçış mekanizmaları ile ilgili olduğunu varsayabiliriz.

Sonuç olarak, çalışmamızdan edindiğimiz gözlemler 1.5-2.5 J/cm<sup>2</sup> arasındaki dozlarda PUVA tedavisinin keratinositlerdeki çoğalmayı baskıladığı fakat 2.5-3.5 J/cm<sup>2</sup> arasındaki dozların ise DNA hasarına sebep olarak DNA onarım ve apoptozis mekanizması ile ilgili genleri tetiklediği yönündedir. Diğer deri tiplerini de kapsayan sağlıklı ve psoriatik deride yapılacak ileri çalışmaların, PUVA tedavisinin hücresel seviyede etki mekanizmalarına ışık tutacağına inanıyoruz.

#### Kaynaklar

- Hönigsman H, Szeimies RM, Knobler R, Fitzpatrick TB, Pathak MA, Wolff K: Photochemotherapy and photodynamic therapy. In: Dermatology in General Medicine. Eds. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. 5th ed. New York: McGraw Hill, 1999.p.2880-900.
- Bethea D, Fullmer B, Syed S et al: Psoralen photobiology and photochemotherapy : 50 years of science and medicine. J Dermatol Sci 1999; 19:78-88.
- Krutmann J: Mechanisms of ultraviolet (UV) B and UVA phototherapy. J Invest Dermatol 1999; 4:70-2.
- Johnson R, Staiano-Coico L, Austin L, Cardinale I, Nabeya-Tsukifuji R, Krueger JG: PUVA treatment selectively induces a cell cycle block and subsequent apoptosis in human T lymphocytes. Photochem Photobiol 1996; 63 : 566-71.
- Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB, Jasty R, Castle VP, Nickoloff BJ: Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. Am J Pathol 1997; 151 : 1321-39.
- Coven TR, Walters IB, Cardinale I, Krueger JG: PUVA-induced lymphocyte apoptosis: mechanism of action in psoriasis. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999; 15 : 22-7.
- Vallat VP, Gilleaudeau P, Battat L, et al: PUVA bath therapy strongly suppresses immunological and epidermal activation in psoriasis : a possible cellular basis for remittive therapy. J Exp Med 1994; 180:283-96.
- Morita A, Werfel T, Stege H, et al: Evidence that singlet oxygen-induced human T-helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. J Exp Med 1997; 186:1763-68.
- Vowels BR, Yoo EK, Gasparro FP: Kinetic analysis of apoptosis induction in human cell lines by UVA and 8-MOP. Photochem Photobiol 1996; 63:572-76.

10. Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR: Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J Invest Dermatol* 1996; 107:235-42.
11. Godar DE: UVA1 triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* 1999; 112 : 3-12.
12. Li G, Ho VC: P53 dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 1998; 139 : 3-10.
13. Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14 : 126-30.
14. Gasparro FP: p53 in dermatology. *Arch Dermatol* 1998; 134 : 1029-32.
15. Hall PA, Mckee PH, Menage H, Dover R, Lane D: High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8 : 203-7.
16. Burren R, Scaletta C, Frenk E, Panizzon RG, Applegate LA: Sunlight and carcinogenesis: expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVAI, UVAI+II and solar simulating radiations. *Int J Cancer* 1998; 76: 201-6.
17. Davenport V, Morris JF, Motazed R, Chu AC: P53 induction in normal human skin in vitro following exposure to solar simulated UV and UVB irradiation. *J Photochem Photobiol B* 1999; 49 : 177-86.
18. Wang Y, Rosenstein B, Goldwyn S, Zhang X, Lebwohl M, Wei H: Differential regulation of p53 and bcl-2 expression by UVA and B. *J Invest Dermatol* 1998; 111 : 380-4.
19. Soini Y, Paakkö P, Letho P, Oikarinen A, Vahakangas K: Aberrant accumulation of p53 associates with Ki67 and mitotic count in benign skin lesions. *Br J Dermatol* 1994; 131 : 514-20.
20. Helander SD, Peters MS, Pittelkow MR: Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathological conditions. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29 : 741-8.
21. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 ;31 :13-20.
22. Sawhney N, Hall PA: Ki-67-structure, function and new antibodies. *J Pathol* 1992; 168 : 161-62.
23. Bravo R: Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986; 163 :287-93.
24. Miyagawa S, Okada N, Yoshinari T, et al: Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1989; 93 :678-81.
25. Toschi L, Bravo R: Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107:1623-8.
26. Portonne JP: Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1999; 140 (Suppl. 54): 1-7.
27. Ando M, Kawashima T, Kobayashi H, Ohkawara A: Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody. *J Dermatol Sci* 1990 ; 1: 441-6.
28. Caldwell CJ, Hobbs C, Mckee PH: The relationship of Ki-67 and involucrin expression in proliferative, preneoplastic and neoplastic skin. *Clin Exp Dermatol* 1997; 22 : 11-16.
29. Kanitakis J, Hoyo E, Chouvet B, Thivolet J, Faure M, Claudy A: Keratinocyte proliferation in epidermal keratinocyte disorders evaluated through PCNA/cyclin immunolabelling and AgNOR counting. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1993; 73 :370-75.
30. Wrone-Smith T: Differential expression of cell survival and cell cycle regulatory proteins in cutaneous squamoproliferative lesions. *J Dermatol Sci* 1999; 19(1):53-67.
31. Kawahira K: Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and non-malignant skin diseases. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 413-18.
32. Hockenberry D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
33. Pezzella F, Tse AGD, Cordell JL, Pulford KAF, Gatter KC, Mason DY: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137:225-232.
34. Lu QL, Poulosom R, Wong L, Hanby AM: Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. *J Pathol* 1993; 169 :431-37.
35. Wikonkal NM, Berg RJW, Haselen CW, Horkay I, Remenyik E, Begany A: Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers. *Arch Dermatol* 1997; 133 : 599-602.
36. Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M: Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer* 1994; 74 :1720-4.
37. Bos JD, De Rie MA: The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999; 40 :40-46.
38. Nickoloff N: The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1104-9.
39. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352 : 345-7.
40. Shaulsky G, Goldfinger N, Tosky MS, Levine AJ, Rotter V: Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 1991; 6: 2055-65.
41. Iggo R, Gatter K, Bartek J: Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335:675-9.
42. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane SP: Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 1990; 9:1595-602.
43. Tadini G, Cerri A, Crosti L, Cattoretti G, Berti E: P53 and oncogenes expression in psoriasis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1989; Suppl. 146 :33-35.
44. Hannuksela-Swahn A, Paakkö P, Autio P, Reunala T, Karvonen J, Vahakangas K: Expression of p53 protein before and after PUVA treatment in psoriasis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1999; 79: 195-99.

45. Bülbül Başkan E, Tunalı Ş, Filiz G, Aydoğan K, Sarıcaoğlu H: Psoriasis lezyonlarında Ki-67, PCNA, bcl-2 ve p53 protein ekspresyonları. T Klin Dermatoloji 2001;11:68-72
46. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 1990;348:334-336.
47. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1994; 80: 879-86.
48. Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM: Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. J Pathol 1993;169 :431-37.
49. Teraki Y, Shiohara T: Apoptosis and the skin. Eur J Dermatol 1999; 9 : 413-26.
50. Bianchi L, Farrace MG, Nini G, Piacentini M: Abnormal bcl-2 and tissue transglutaminase expression in psoriatic skin. J Invest Dermatol 1994 ; 103 : 829-33.
51. Wrona-Smith T, Johnson T, Nelson B, et al: Discordant expression of Bcl-x and Bcl-2 by keratinocytes in vitro and psoriatic keratinocytes in vivo. Am J Pathol 1995; 146 : 1079-88.
52. Bükülmez G, Ayhan A, Atakan N, Özkaya O: PUVA tedavisi alan hastalarda p53 ve p21 ekspresyonlarının değerlendirilmesi. T Klin J Dermatol 2000; 10:188-91
53. Şahin S, Bükülmez G, Sungur A, Atakan N: Mycosis Fungoides'de c-myc, bcl-2, p53 ve PCNA protein ekspresyonları ve apoptozis. Turkderm 2001; 35: 26-31.