

Darbant UVB Fototerapinin Bcl-2 ve P53 Ekspresyonlarına Etkisi: Pilot Çalışma

Nilsel İlter*, Ayşe Dursun**, Esra Adışen*
Özlem Erdem*, Mehmet Ali Gürer*

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi *Dermatoloji ve **Patoloji Anabilim Dalları

Özet

Ultraviyole B (UVB)'nin karsinojenik etkisi giderek daha çok ilgi çekmektedir. Apoptozisi regüle eden genler içinde en önemlileri p53 ve bcl-2'dir. Biz bu çalışmada, UVB ve kutanöz fotokarsinogenez arasındaki olası ilişkiyi tespit edebilmek için kümülatif UVB dozlarının p53 ve bcl-2 ekspresyonlarına etkisini araştırdık.

Çalışma grubunu çeşitli primer kutanöz hastalıklar için darbant-UVB fototerapisi alan 42 hasta oluşturdu. İmmünohistokimyasal değerlendirme için Avidin-biyotin-peroksidaz metodu kullanıldı. p53 için nükleer boyanma ve bcl-2 için ise sitoplazmik boyanma esas alındı.

Kümülatif darbant-UVB dozlarıyla p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Kümülatif darbant UVB dozlarıyla ile bcl-2 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı olmayan zayıf bir korelasyon tespit edildi.

Biz bu sonuçlarla, p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak tespit edilmesi için daha yüksek kümülatif dozların gerekli olduğunu ya da tekrarlayan UVB dozlarının kutanöz karsinogenezisi değerlendirmede daha iyi bir model oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: UVB, bcl-2, p53

İlter N, Dursun A, Adışen E, Erdem Ö, Gürer MA. Darbant UVB fototerapinin bcl-2 ve p53 ekspresyonlarına etkisi: Pilot çalışma. Türkderm 2006;40(1):23-26

Summary

Background: Carcinogenicity of ultraviolet B (UVB) therapy is driving attention increasingly. Numerous genes that regulates apoptosis have been identified, among them p53 and bcl-2 are well defined. In this study, we aimed to document the impact of the increasing cumulative doses on p53 and bcl-2 expression in order to define a relationship between narrowband UVB and carcinogenesis.

Methods: 42 patients receiving narrowband UVB treatment for various primary cutaneous disorders were enrolled in the study. Avidin-biotin-peroxidase method was used for the immunohistochemical evaluation. Nuclear staining for p53 and cytoplasmic staining for bcl-2 were evaluated as positive.

Results: No correlation was found between the cumulative doses of NB-UVB and p53 expression. The statistical analysis between the cumulative doses of NB-UVB and bcl-2 expression showed a weak correlation and this was not statistically significant.

Conclusions: High cumulative UVB doses could be necessary to induce p53 and bcl-2 expression detectable by immunohistochemical staining and perhaps repetitive exposure to UVB is a better model for cutaneous photocarcinogenesis.

Key Words: Narrowband UVB, bcl-2, p53

İlter N, Dursun A, Adışen E, Erdem Ö, Gürer MA. The effect of narrowband UVB phototherapy on the expression of bcl-2 and p53: A preliminary study. Türkderm 2006;40(1):23-26

Ultraviyole (UV) radyasyonunun deri kanserlerinin gelişimindeki rolü uzun yıllardır bilinmektedir. Fotokarsinogenez ile ilgili çalışmalarda en çok PUVA üzerine yoğunlaşmış ve bugün, PUVA fototerapisinin melanoma dışı deri kanserlerine yol açtığı kesin olarak anlaşılmıştır¹.

UVB'nin özel bir fraksiyonu olan darbant UVB (311nm) ilk kez 1984 yılında psoriasis tedavisinde kullanılmıştır². Günümüzde pek çok hastalığın fototerapisinde tercih edilen darbant UVB'nin uzun vadedeki etkileri ise bilinmemektedir ve araştırılması gerekmektedir.

Apoptozis, UV aracılı DNA hasarı ve takiben tümör gelişiminde vücudun en önemli savunma mekanizmasıdır. Apoptozis düzenleyici genler arasında en önemlileri p53 ve bcl-2'dir. Biz bu çalışmada, UVB ile kutanöz fotokarsinogenez arasındaki olası ilişkiyi tespit edebilmek için kümülatif UVB dozlarının p53 ve bcl-2 ekspresyonlarına etkisini araştırdık.

Gereç ve Yöntem

Çalışma grubu: Çalışmaya 23'ü kadın 19'u erkek toplam 42 hasta alındı. Yaşları 17 ile 45 arasında değişen olguların yaş ortalaması 36.7 idi. Çalışma grubunu oluşturan hastalar, çeşitli primer kutanöz hastalıklar için darbant-UVB fototerapisi alan hastalardı. Çalışma grubumuzu oluşturan hastaların 13'ü vitiligo, 24'ü psoriasis, 2'si mikozis fungoides ve 1'i jeneralize pruritus nedeniyle tedavi almaktaydı.

Darbant UVB fototerapi: Tüm hastalara cilt tiplerine uygun UVB dozlarıyla tedaviye başlandı. Takip edilen hastaların kümülatif UVB dozları 0.8j/cm² ile 239j/cm² (ortalama: 55.79 j/cm²) arasında değişmekteydi (Tablo 1).

Deri biyopsileri: Hastaların gluteal bölgelerinden, 4mm'lik punch ile normal deri biyopsi örnekleri temin edildi. Gluteal bölge, bu hastalarda hem lezyon olmaması hem de güneş görmeyen ancak UVB'den etkilenen bir bölge olması nedeniyle tercih edildi. 42 hastadan temin edilen 42 biyopsi örneği değerlendirmeye alındı.

İmmünohistokimyasal boyama: İmmünohistokimyasal değerlendirme Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Biyopsi materyalleri %10 formaldehitte fikse edildi ve parafine gömüldü. Parafine gömülü materyalden 4µm'lik kesitler hazırlandı. İmmünohistokimyasal değerlendir-

me için Avidin-biyotin-peroksidaz metodu kullanıldı. P53 için nükleer boyanma ve bcl-2 için sitoplazmik boyanma esas alındı (Şekil 1 ve 2). Rasgele seçilmiş dört ardışık epidermal alanda 1000 keratinosit sayılarak, bunların içinde nükleer boyanma gösteren hücrelerin yüzde oranları p53 pozitifliğinin hesaplanmasında, sitoplazmik boyanma gösteren hücrelerin yüzde oranları bcl-2 pozitifliğinin hesaplanmasında kullanıldı (Tablo 1).

İstatistiksel analiz: İstatistiksel analizler Pearson'un korelasyon methodu kullanılarak yapıldı. Darbant UVB dozları joule: j/cm² cinsinden hesaplandı.

Bulgular

Kümülatif darbant UVB dozlarıyla p53 ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı (p>0.05). Kümülatif darbant UVB dozlarıyla bcl-2 ekspresyonlarının değerlendirilmesinde ise .05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı ters korelasyon saptandı. (2-tailed).

Tartışma

Kutanöz karsinogenez gelişiminde tekrarlayan UV maruziyetleri ve kümülatif etkileri önemlidir. UV ile ilişkili deri hasarının büyük bir kısmında güneş ışığının UVB (290-320 nm) fraksiyonu sorumlu tutulmaktadır³. Psoriasis için PUVA tedavisi alan hastalarda gelişen skuamöz hücreli karsinomlarda UVB tipi mutasyonların saptanması da UVB'nin fotokarsinogenezdeki mutlak rolüne dikkat çekmektedir^{4,5}. UV insan epidermisinde keratinosit hasarına ve ölümüne yol açar ve "sunburn cells" olarak tanımlanan hücrelerin oluşmasına neden olur^{6,7}. UV aracılı karsinogenezin moleküler basamakları henüz tam

Tablo 1: Kümülatif darbant -UVB dozları, p53 ve bcl-2 ekspresyon oranları.

Hastalar	J/cm 2*	p53 (%)	bcl-2 (%)	Hastalar	J/cm 2*	p53 (%)	bcl-2(%)
1	1.2	-	10	22	6	10	2
2	33.2	5	2	23	1.6	15	10
3	101	70	5	24	5.8	10	2
4	162	5	25	25	6	15	5
5	107	15	20	26	131.6	-	2
6	77.2	10	25	27	9.6	20	5
7	25	5	2	28	46	10	10
8	27.8	35	25	29	118	10	5
9	92.2	10	5	30	170	2	10
10	0.8	1	2	31	123	8	10
11	38.8	45	5	32	108.4	10	10
12	83.6	15	2	33	35	15	25
13	50	20	15	34	64	45	25
14	14.4	10	15	35	97	20	10
15	23.2	10	5	36	2.8	-	5
16	239	15	2	37	50	1	2
17	41	25	15	38	95	5	10
18	1.6	2	2	39	65	5	5
19	27	20	15	40	36.4	5	5
20	36.4	20	2	41	57	10	2
21	50	2	15	42	11.2	10	5

* Kümülatif darbant UVB dozları

olarak anlaşılacakla birlikte, bu hücrelerin oluşumunun ve birikmesinin deri kanserlerinin gelişiminde önemli oldukları düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, biz çalışmamızda darbant UVB'nin apoptotik mekanizmalardaki rolünü ve p53 ve bcl-2 gen ekspresyonlarına etkilerini araştırdık.

Bcl-2 ve p53, apoptozisi düzenleyen genlerdir ve bu özellikleriyle karsinogenez mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda vazgeçilmez kabul edilirler. P53 kültürü hücrelerde, hücre proliferasyonunu inhibe eden ve transkripsiyonel faktör benzeri özellikler gösteren bir fosfoproteini kodlayan tümör süpresör genidir⁸. P53 proteini normal hücrelerde düşük seviyelerde tespit edilebilir⁹. DNA hasarını takiben p53 hücre proliferasyonunu döngüyü G1 fazında duraklatır ve DNA onarımı için olanak tanır. Hücre hasarının onarımında başarısızlık söz konusu ise, p53 hücreleri apoptozis yönünde uyarır ve hasarlı hücre ortadan kaldırılır⁸. P53'ün apoptozisi düzenleyici etkisi DNA hasarının onarımı bozuk olan kseroderma pigmentozumlu hastalarda çalışılmıştır. Bu hastaların hücrelerinde, yüksek miktarlarda p53 ekspresyonu tespit edilmiş, bu hücrelerin UV hasarını takiben apoptozise daha duyarlı olmaları dikkat çekmiştir¹⁰. P53 fonksiyonlarını yerine getiremediğinde hücrelerde somatik mutasyonlar oluşmaktadır⁸. İnsan kanserlerinin %50'sinden fazlası p53 mutasyonları sonucu gelişmektedir¹¹.

Bcl-2 multigen ailesinde yer alan bcl-2, apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol oynar¹². Bcl-2 temel olarak antiapoptotik bir genidir^{9,12}. Normal deride bcl-2 ekspresyonu düşük seviyelerde ve proliferasyon yeteneği bulunan, uzun ömürlü hücrelerde tanımlanmıştır^{6,12,13}. Son yıllarda kutanöz karsinogenez ile bcl-2 ekspresyonları arasındaki ilişki sorgulanmış ve bcl-2'nin onkogenik potansiyeli pek çok malignanside tespit edilmiştir¹⁴⁻¹⁶. Malign melanom, Merkel hücreli karsinom, bazal hücreli karsinom ve Bowen hastalığı gibi pek çok primer kutanöz karsinomda bcl-2 aşırı miktarlarda salgınmaktadır¹⁷.

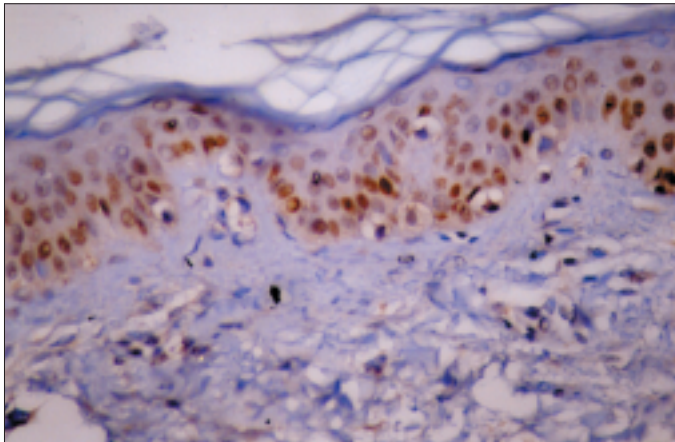
Normal deride UV sonrası p53 ekspresyonu olduğu^{8,18,19} ve kronik olarak UV'ye maruz kalan epidermiste yoğun p53 birikimi bulunduğu tespit edilmiştir¹⁹. Yine, güneş gören ancak histolojik olarak normal görünen epidermiste odaklar halinde p53 mutasyonları gelişmektedir¹⁹.

Çalışmalarda UVB, UVC, UVA ve UVA1 radyasyonunun apoptozisi indüklediği ve bu olayın p53 ekspresyonunda artışla^{5,10,20-23} ve bcl-2 ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{3,5,6,10,24-27}. Bugün için UV ile tetiklenen hücre değişikliklerinin

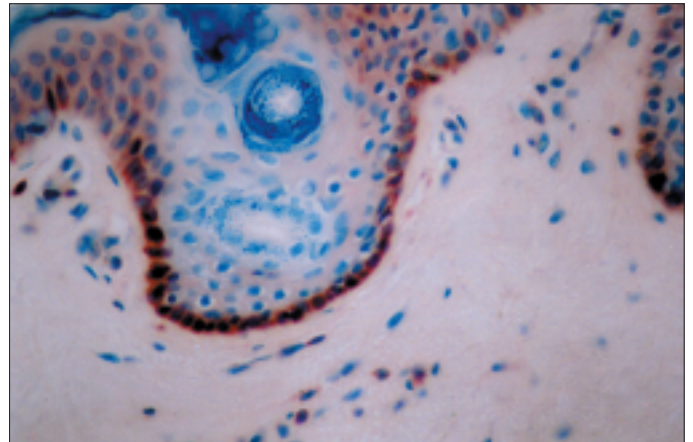
DNA hasarı ile başladığı bilinmektedir^{10,21,22}. Hücre hasarı ile başlayan ve hücre ölümü ya da mutasyonla sonuçlanan bu olaylar zincirinde en önemli nokta apoptotik kaskatın başlama zamanıdır. Mass ve ark.ları UVB radyasyonunun apoptotik proteinlerin zamana bağımlı ekspresyon oranlarına etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada UVB sonrası ilk olarak 12. saatte saptanan apoptotik keratinositler p53 ile boyanırlarken, bcl-2 ile boyanmamışlardır⁷. Bcl-2 ekspresyonunun tek doz UV'yi takiben azaldığı ise bir diğer çalışmayla kanıtlanmıştır. Tek doz radyasyon sonrası 3. ve 6. saatlerde epidermisteki bcl-2 salınımının %40 oranda azaldığı gösterilmiştir⁶. Normal derinin bcl-2 ekspresyonunda artışlar kimyasallarla tetiklenen tümörlerin gelişimine yatkınlık oluşturmaktadır²⁸. Hayvan deneylerinde bcl-2 nin UVB sonrası gelişen sunburn cell oranında azalma sağladığı ve tümör gelişimini önlediği ya da geciktirebildiği gösterilmiştir¹⁷.

UVB'nin apoptotik mekanizmalara etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, UVB radyasyonunun p53 ekspresyonunu artırdığı^{5,7,10} ve bcl-2 ekspresyonunu ise azalttığı ya da değiştirmedeği görülmektedir^{5,6,10}. Bu çalışmalarda UVB'nin apoptotik genlerin ekspresyonlarında değişiklik yaptığı gösterilmiş, ancak PUVA'nın aksine UVB kümülatif dozlarının fotokarsinogenezdeki rolü değerlendirilmemiştir. Bu aşamada önemli olan UVB kümülatif dozlarının apoptotik gen ekspresyonlarına etkileridir. Çalışmamızda kümülatif darbant-UVB'nin apoptozis üzerine etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır. Literatürde kümülatif darbant UVB dozlarıyla bcl-2 ve p53 ekspresyonları arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışma yoktur.

Çalışmamızda, kümülatif darbant UVB dozlarıyla p53 pozitiflik oranı arasında herhangi bir ilişki tespit edilemedi. Bazı çalışmalarda UVB sonrası p53 ekspresyonlarındaki artış, hücrenin hasarlı hücreleri ortadan kaldırma çabası şeklinde açıklanmaktadır^{5,7,10}. Bu koruyucu mekanizma, kanser gelişiminin önlenmesi için gerekli olmaktadır. Çalışmamızda kümülatif darbant UVB dozlarının bcl-2 ekspresyonlarına etkisini gösterilemedi. Keratinositlere bcl-2 geninin transferi UVB aracılı apoptozisi baskılamada başarılı bulunmuş²⁷, ancak UVB radyasyonunun bcl-2 gen ekspresyonuna etkisi azaltma ya da etkilememe şeklinde olmuştur^{5,7,10}. Kümülatif UVB dozlarının bcl-2 gen ekspresyonuna etkisi ise daha önce çalışılmamıştır. Sonuçta, p53 ekspresyonu ile bcl-2 ekspresyonu arasındaki dengenin UV aracılı apoptozisin düzenlenmesinde etkili oldukları



Şekil 1: Epidermiste kuvvetli p53 boyanması. (Avidin-Biyotin Peroksidaz, DABx200).



Şekil 2: Bazal keratinositlerde sitoplazmik bcl-2 pozitifliği (Avidin-Biyotin Peroksidaz, DABx400).

anlaşılmaktadır⁵.

Bu çalışmada p53 ve bcl-2 ile kümülatif darbant-UVB dozları arasında ilişki tespit edilememesi 1- kümülatif dozların çok yüksek olmamasına, 2- deri tiplerinin farklılığına 3- UV yanıtlarının bireysel farklılığına bağlı olabilir. Biz bu sonuçları, immünohistokimyasal boyanmanın sağlanması için daha yüksek kümülatif dozların gerektiğine işaret ettiğini düşünmekteyiz. P53 boyanmaları bireysel olarak dikkate alındığında kümülatif dozu yüksek olan bazı hastalarda p53 ekspresyonun yüksek olması dikkat çekiciydi, ancak bu bulgu istatistiksel değerlendirilmeye anlamlı olarak yansımadi. Bcl-2 korelasyon analizinin sonuçları, bu protein ile UVB kümülatif dozu arasındaki ilişkiyi yorumlamamıza olanak vermedi. Biz sonraki aşamada, çalışmanın devamı olarak, daha yüksek kümülatif dozlarla bcl-2 ve p53 ekspresyonlarını tekrar değerlendirmeyi planlamaktayız. Sonuç olarak biz tekrarlayan UVB dozlarının kutanöz karsinogenezisi değerlendirmede daha iyi bir model oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Abel EA: Phototherapy: UVB and PUVA. *Cutis* 1999; 64: 339-342.
2. Hönlsmann H: Phototherapy for psoriasis. *Clin Dermatol* 2001; 26: 343-350.
3. Assefa Z, Garmyn M, Vantieghem A: Ultraviolet B radiation induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of bcl-2. *FEBS Letters* 1999; 540: 123-132.
4. Nataraj AJ, Wolf P, Cerroni L, Ananthaswamy HN: P53 mutation in squamous cell carcinomas from psoriasis patients treated with psoralen+UVA (PUVA). *J Invest Dermatol* 1997; 109: 238-243.
5. Wang XM, McNiff JM, Klump V: An unexpected spectrum of p53 mutations from squamous cell carcinomas in psoriasis patients treated with PUVA. *Photochem Photobiol* 1997; 66: 294-299.
6. Isoherranen K, Sauroja I, Jansen C, Punnonen K: UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 1999; 291(4): 212-216.
7. Mass P, Hoffmann K, Gambichler T, Altmeyer P, Mannherz HG: Premature keratinocyte death and expression of marker proteins of apoptosis in human skin after UVB exposure. *Arch Dermatol Res* 2003; 295(2): 71-79.
8. Soini Y, Kamel D, Paakko P: Aberrant accumulation of p53 associates with ki-67 and mitotic count in benign skin conditions. *Br J Dermatol* 1994; 131: 514-520.
9. Helander SD, Peters MS, Pittelkow MR: Expression of p53 protein in benign and malignant epidermal pathologic conditions. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:741-748.
10. Washio F, Ueda M, Ito A, Ichihashi M: Higher susceptibility to apoptosis following ultraviolet B irradiation of xeroderma pigmentosum fibroblasts is accompanied by upregulation of p53 and downregulation of bcl-2. *Br J Dermatol* 1999; 140(6): 1031-1037.
11. Moles JP, Moyret C, Guillot B: P53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene* 1993; 8: 583-588.
12. Sellheyer K, Krahl D, Ratch H: Distribution of bcl-2 and bax in embryonic and fetal human skin. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 1-7.
13. Wrono-smith T, Bergstrom J, Quevodo ME, Reddy V, Steril GC, Nickoloff B: Differential expression of cell survival and cell cycle regulatory proteins in cutaneous squamoproliferative lesions. *J Dermatol Sci* 1999; 19: 53-67.
14. Wikonkal NM, Berg RJW, van Haselen CW: Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers. *Arch Dermatol* 1997; 133: 599-602.
15. Morales-Ducret CRJ, van de Rijn M, Leprun DP: Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995; 131: 909-912.
16. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM: Expression of the proto-oncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6940-6944.
17. Rossiter H, Beissert S, Mayer C: Targeted expression of bcl-2 to murine basal epidermal keratinocytes results in paradoxical retardation of ultraviolet and chemical induced tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61: 3619-3626.
18. Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M: Sun-exposure aging dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumor cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancers. *Virchows Arch* 1999; 434: 193-199.
19. Ren Z-P, Ahmadian A, Ponten F: Benign clonal keratinocyte patches with p53 mutations show no genetic link to synchronous squamous cell precancer or cancer in human skin. *Am J Pathol* 1997; 150: 1791-1803.
20. Reinke V, Lozano G: Differential activation of p53 target in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat Res* 1997; 148:115-122.
21. Cotton J, Spandau DF: Ultraviolet B-radiation dose influences the induction of apoptosis and p53 in human keratinocytes. *Radiat Res* 1997; 147: 148-155.
22. Ibuki Y, Goto R: Antiapoptotic effects induced by different wavelengths of ultraviolet light. *Photochem Photobiol* 2002; 75: 495-502.
23. Breuckmann F, Pieck C, Kreuter A: Opposing effects of UVA1 phototherapy on the expression of bcl-2 and p53 in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 2001; 293: 178-183.
24. Haake AR, Polakowska RR: UV induced apoptosis in skin equivalents: inhibition by phorbol ester and bcl-2 overexpression. *Cell Death Differ* 1995; 2: 183-193.
25. Gillardion F, Eschenfeldet C, Uhlmann E, Hartschuh W, Zimmerman M: Differential regulation of c-fos, fos B, c-jun, bcl-2 and bax expression in rat skin following single or chronic ultraviolet radiation and in vivo modulation by antisense oligodeoxynucleotide superfusion. *Oncogene* 1994; 9: 3219-3225.
26. Pourzard C, Rossier G, Reelfs O, Borner C, Tyrell RM: The overexpression of bcl-2 inhibits UVA mediated immediate apoptosis in rat 6 fibroblasts: evidence for involvement of bcl-2 as an antioxidant. *Cancer Res* 1997; 57: 1405-1411.
27. Takahashi H, Honma M, Yamamoto AI: In vitro and in vivo transfer of bcl-2 gene into keratinocytes suppresses UVB-induced apoptosis. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 579-586.
28. Rodriguez-Villanueva J, Greenalgh D: Human keratin -1 bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction and are susceptible to skin tumor formation. *Oncogene* 1998;16: 853-863.

