

PUVA Tedavisi Alan Hastalarda p53 ve p21 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

EVALUATION OF p53 AND p21 EXPRESSIONS IN PATIENTS TREATED WITH PUVA

Gül BÜKÜLMEZ*, Ayşe AYHAN**, Nilgün ATAKAN***, Özay ÖZKAYA****

* Yrd.Doç.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji AD,
** Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD,
*** Prof.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji AD,
**** Uz.Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, ANKARA

Özet

Amaç: PUVA (psoralen+UVA) tedavisi bir çok deri hastalığının da uygulanan etkili bir tedavi yöntemidir. Uzun süreli kullanımlarında deri kanserlerinin riskini artırdığı bilinmektedir. PUVA tedavisi sonrasında gelişen deri kanserlerinde p53 geni mutasyona uğramaktadır. Deri kanserlerinin gelişimi sırasında p53 gen mutasyonları erken basamaklarda oluşmaktadır. Bu çalışmanın amacı PUVA tedavisinin p53 ve p21 gen ekspresyonlarını nasıl etkilediğini incelemek ve eğer PUVA tedavisi, p53 proteininde artışa, dolayısıyla gende mutasyona neden olursa deri kanseri gelişebilecek hastaları önceden tesbit etmeye olanak sağlamaktır.

Çalışmanın Yapıldığı Yer: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ve Patoloji Anabilim Dalları.

Materyel ve Metod: PUVA tedavisi alan 16 gönüllü hastanın normal derisinden alınan biyopsi örnekleri immünohistokimya yöntemi ile p53 ve p21 gen ekspresyonları açısından değerlendirildi.

Bulgular: 16 biyopsi örneğinin 5'inde p53, 11'inde p21 ekspresyonu saptandı. Birim alandaki pozitif ekspresyon gösteren hücre sayısı normal deri örneklerinden farklı değildi. Kümülatif PUVA dozu ile p53 ve p21 ekspresyonları arasında da ilişki mevcut değildi.

Sonuç: Bulgular PUVA tedavisinin normal deride artmış p53 ekspresyonuna neden olmadığını göstermektedir. Bu gende mutasyon oluşabilmesi için ya daha yüksek PUVA dozlarına gereksinim olduğunu yada deri kanserlerinin gelişiminde immünsüpresyon gibi diğer faktörlerin de etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: PUVA, p53, p21, Deri kanseri

T Klin Dermatoloji 2000, 10:188-191

Geliş Tarihi: 09.05.2000

Yazışma Adresi: Dr.Gül BÜKÜLMEZ
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dermatoloji AD
06100, Sıhıye, ANKARA

Summary

Background and Objective: PUVA (psoralen+UVA) is an effective therapy widely-used in various skin disorders. It may lead to development of skin cancers, especially in long-term treatment protocols. In PUVA related skin cancers p53 gene is known to be mutated. In general, mutations in p53 gene occurs in early stages of carcinogenesis of skin cancers. Purpose of this study was to evaluate how PUVA treatment affected p53 and p21 gen expressions and to enable documentation of high risk patients if PUVA increased p53 protein by leading to mutation in the gene.

Place of the study: Hacettepe University Faculty of Medicine, Departments of Dermatology and Pathology

Materials and Methods: Skin biopsies from 16 volunteered patients undergoing PUVA treatment were examined for expressions of p53 and p21 genes by immunohistochemistry.

Results: p53 protein was detected in 5 and p21 protein was detected in 11 out of 16 samples. Number of positively stained cells in a unit area was not different from normal controls. Cumulative dose of PUVA was not related to p53 and p21 expressions.

Conclusion: Our results demonstrate that PUVA treatment does not lead to increased p53 expression in normal skin. We think higher cumulative doses are needed for p53 mutations to occur or development of skin cancers requires additional factors like immunosuppression.

Key Words: PUVA, p53, p21, Skin cancer

T Klin J Dermatol 2000, 10:188-191

Tümör süpresör gen olan p53'de ortaya çıkan özgün mutasyonların insan kanserlerinde en sık rastlanan genetik anomali olduğu bilinmektedir. Bu kanserler arasında, derinin skuamöz hücreli karsinomlarının (SHK'lerin), p53 geninde ultraviyole (UV) ile oluştuğu bilinen özgün mutasyonları taşıdığı gösterilmiştir (1). Bu özgün mutasyonların sadece SHK'lerde değil premalign lezyonlarda da saptanabilmesi p53 mutasyonlarının, SHK gelişiminin erken dönemlerinde ortaya çıkan ve karsinogenezin erken basamaklarında yeralan bir değişiklik olduğunu göstermektedir (2). Hatta kronik olarak güneşe maruz kalan lezyonsuz, normal deri örneklerinde bile p53 proteininin artmış ekspresyonuna ve p53 proteininde mutasyonlara rastlanmaktadır (3).

Hücre siklusunu durdurabilen bir diğer protein p21'dir. P21 bunu G1 fazında siklin bağımlı kinazları inhibe ederek gerçekleştirir. Artmış p53 proteini, p21'i transkripsiyonunu arttırarak aktifleştirebilir veya p21 p53'den bağımsız olarak aktif olabilir (4). p21 hücre bölünmesini inhibe edebileceğinden, p21 genindeki mutasyonların veya p21 fonksiyonundaki değişikliklerin, tümör gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Ancak şu ana kadar az sayıdaki tümörün p21 geninde mutasyon taşıdığı gösterilmiştir (5).

PUVA (psoralen+UVA) tedavisi psoriasisde sık kullanılan, etkili bir tedavi yöntemidir. Ancak bu tedavinin yan etkisi olarak, SHK gelişebildiği ve bu karsinomların derideki diğer SHK gibi aynı şekilde p53 ekspresyonu gösterdiği bilinmektedir (6,7).

Bu çalışma, PUVA tedavisinin normal derideki p53 ve p21 ekspresyonlarını nasıl etkilediğini ve bu ekspresyonların alınan kümülatif PUVA dozuyla ilişkisini araştırmak amacıyla planlandı. Eğer böyle bir ilişki mevcut ise, deri kanseri gelişebilecek riskli hastaları önceden tespit etmek veya malignensi gelişim riskini arttırmayacak belirli bir PUVA dozu saptamak mümkün olabilecektir.

Materyel ve Metod

Bu çalışma için değişik nedenlerle PUVA tedavisi alan 16 gönüllü hastadan 4 mm'lik punch biyopsiler (her hastadan bir tane) alındı. PUVA tedavisi öncesinde ultraviyole ışınlarına maruz kalmamış olduğu düşünülerek glutea bölgesi bi-

yopsi yeri olarak seçildi. Biyopsi alınan bölgenin lezyonsuz olması biyopsi öncesinde kontrol edildi. Tüm biyopsiler son PUVA tedavisinden en az 48 saat sonra alındı.

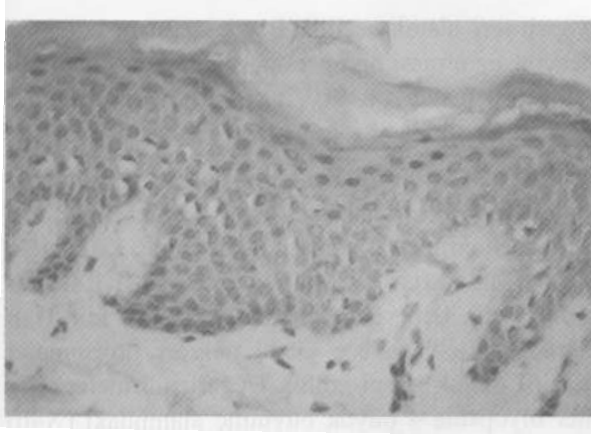
Formalin ile fikse edilip parafine gömülen dokulardan hazırlanan 4 µm'lik kesitler ABC immunohistokimyasal yöntem ile boyandı. Kullanılan primer antikolar p53 (Novocastro 1801,1:40) ve p21 (Santa Cruz Biotechnology, 1:250) idi. Tüm antikolar için sadece güçlü nükleer boyanmalar pozitif olarak kabul edildi. Değerlendirmeler için, her biyopside 4 büyük büyütme alanındaki (X40) pozitif boyanan hücreler sayıldı ve bir birim alanındaki pozitif hücre sayısı belirlendi.

İstatistiksel analizler SPSS 7.5 (Statistical Packages for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) programı ile yapıldı. Analizler için kümülatif PUVA dozları 1000 j/cm²'nin altında ve üstünde olmak üzere iki grupta toplandı. 1000 j/cm² dozunun üzeri, yüksek doz olarak kabul edildi. Anti-p53 boyamasında, boyanan hücre sayısının az olması nedeniyle sonuçlar negatif veya pozitif olarak değerlendirildi. P53 ekspresyonu ile kümülatif PUVA dozu arasındaki ilişki için Ki-kare testi; PCNA, Ki-67, p21 ile kümülatif PUVA dozu arasındaki ilişki için ise Mann Whitney-U testi ve Spearman'ın korelasyon katsayısı analizleri kullanıldı. p21 ve p53 ekspresyonlarının kendi aralarındaki ilişki için Spearman'ın korelasyon katsayısı analizinden yararlandı.

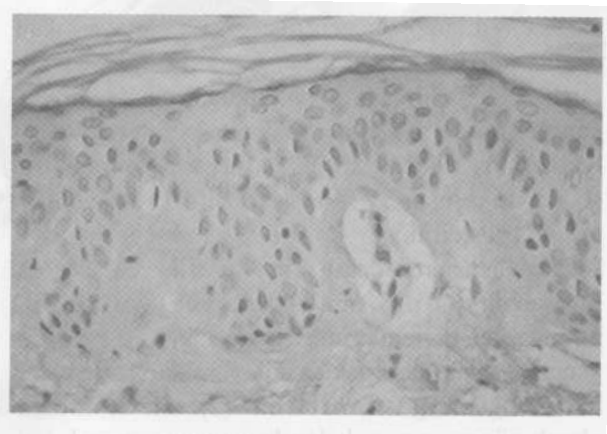
Bulgular

Çalışmaya alınan 16 hastanın 8'si erkek 8'i kadındı. Hastaların aldığı kümülatif PUVA dozu 99-2008 j/cm², ortalaması 701,31±532,71 j/cm², ortancası ise 607,50 j/cm² idi. 12 hastanın aldığı kümülatif doz 1000 j/cm²'nin altında iken, 4 hasta 1000 j/cm²'nin üzerinde yani yüksek doza maruz kalmıştı.

Biyopsi örneklerinden 11'inde p21 ekspresyonu mevcuttu (Şekil 1). Pozitif boyanan hücre sayısı 0 ile 19 arasında değişmekte olup ortalaması 3,93±5,43, ortancası 1,5 idi. p53 ekspresyonu ise 5 biyopsi örneğinde görüldü (Şekil 2). Bu biyopsilerdeki pozitif boyanan hücre sayısı birim alanda 1-3 hücre arasında değişmekteydi. Normal deri örneklerinde p53 ekspresyonu birim alanda 1-2 hücrede pozitif olarak, p21 ekspresyonu ise ortala-



Şekil 1. Spinöz tabakada nükleer p21 ekspresyonu.



Şekil 2. Anti-p53 ile pozitif boyanma gösteren hücreler.

ma 3,92 hücrede saptandı. Kümülatif PUVA dozu ile p21 ve p53 ekspresyonları arasında korelasyon bulunmadı ($p>0,05$). p53, p21 ekspresyonları arasında da ilişki mevcut değildi ($p>0,05$).

Tartışma

PUVA tedavisi birçok değişik deri hastalığında kullanılan, iyi bilinen ve etkili bir tedavi yöntemidir. Kısa süreli tedavi protokolleri olduğu gibi, psoriasis ve mikozis fungoides gibi hastalıklarda uzun süreli idame tedaviler gerekmektedir. Uzun süreli tedavinin gerekli olduğu durumlarda PUVA'nın derideki SHK ve bazal hücreli karsinom risklerini arttırdığı bilinmektedir. Bu risk özellikle yüksek kümülatif dozlara maruz kalanlarda daha fazladır (8).

İmmünohistokimyasal olarak p53 proteinin intranükleer birikiminin gösterilmesi bir çok çalışmada p53 gen ekspresyonunu araştırmak için kullanılmıştır. Genel olarak, p53 mutasyonlarının proteinin stabilizasyonunu arttırdığı ve bu nedenle immunohistokimya ile gösterilebildiği bilinmektedir (9). Ancak immünohistokimya çalışmalarında parafin bloklarda kullanılan antikolar ile mutant olmayan, normal (wild-type) p53 proteini de boyandığı için bazı hücrelerde normal p53'ün artmış ekspresyonuna rastlanmaktadır. Örneğin, güneşe maruz kalmak p53'ün mutant olmayan formunun miktarını arttırmakta ve immünohistokimyasal olarak gösterilebilmesine olanak sağlamaktadır (10). Bu nedenle daha önce güneşe maruz kalmış olan bölgelerden alınan biyopsilerin çalışmamızda değerlendirilmesi hatalı olabilirdi.

Bu çalışmada daha önce güneşe maruz kalmamış deri örneklerinde PUVA'nın deri kanserleri gelişimindeki rolünü araştırdık. p53 mutasyonlarını gösteren çalışmalarda; hem tipik PUVA mutasyonları (T-A) (11) hem de ultraviyole ile ortaya çıkan mutasyonlar, (C-T veya CC-TT) PUVA tedavisi sonrasında gelişen deri kanserlerinde gösterilmiştir (12). Çalışmamızda, 16 hastanın 5'inde p53 ekspresyonu saptandı ve boyanma birim alanında 1-3 hücre düzeyindeydi. Elde edilen sonuç normal deride görülen ekspresyondan farklı değildi. p53 ekspresyonu saptanan 5 hastanın aldıkları kümülatif doz 99- 1200 j/cm² arasında değişmekte olup, yalnızca 1 hastanın almış olduğu kümülatif doz 1000 j/cm²'nin üzerindeydi. Az sayıda hücrede anti-p53 boyanması saptamamızın teknik nedenlerden kaynaklanabileceğini düşünmüyoruz. Çünkü biyopsi örneklerinin hepsi anında formalin ile fikse edilip, çoğunluğu sadece 24 saat formalinde bekledi. Kümülatif PUVA dozu ile p53 ekspresyonu arasında ilişki görülmemesi, PUVA tedavisi alan hastalardaki premalign veya malign lezyonların gelişimine, erken dönemde ve tek başına p53 gen mutasyonlarının neden olamayacağını ve p53 ekspresyonunun da sadece PUVA'ya maruz kalmakla açıklanamayacağını düşündürmektedir. Bu hastalarda deri neoplazileri ve p53 mutasyonlarının daha geç dönemlerde ve başka faktörlerin de etkisi ile ortaya çıkabildiği söylenebilir.

p21 proteini p53 tarafından aktifleştirilebilmektedir. Siklin bağımlı kinaz komplekslerinin inaktivasyonu yolu ile hücre siklusunu durdurabilen p21'in derinin skuamöz hücreli karsinom-

larında mutasyona uğradığı da bildirilmiştir (13). Ayrıca başka bir araştırmada güneşe hiç maruz kalmamış deride p21 ekspresyonu yok iken, ultraviyole radyasyonu sonrasında 4. saatte p21 ekspresyonu ortaya çıkmıştır. Bu ekspresyon p53 ekspresyonu ile paralellik göstermekte olup, yazarlar deride UV radyasyonu sonrasında ortaya çıkan p21 ekspresyonunun p53 ile regüle edildiğini düşünmektedirler (14). Şu ana kadar PUVA hastalarında oluşan deri kanserlerindeki p21 ekspresyonuna ait bilgi mevcut değildir. Ancak çalışmamız p21 proteinin ekspresyonunun maruz kalınan PUVA dozu ile artmadığını göstermektedir. Ayrıca p21 ile p53 ekspresyonları ilişkili görülmemektedir. Bu da p21 ekspresyonunun p53'den bağımsız bir yol izleyebileceği görüşünü desteklemektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız PUVA'nın normal deride artmış p53 ve p21 ekspresyonlarına neden olmadığını ve maruz kalınan PUVA dozu ile bu ekspresyonların ilişkilendirilemediğini göstermektedir. p53 genindeki mutasyonların oluşabilmesi için ya daha yüksek PUVA dozlarına gereksinim olduğunu ya da tümör gelişiminde PUVA ile ortaya çıkan immünosupresyon gibi diğer faktörlerin de rol oynadığını düşünmekteyiz.

Teşekkür: HÜTF Dermatoloji Anabilim Dalı PUVA Ünitesi teknisyenleri, Aynur Dirî ve Hüsne Öztürk'e çalışmadaki katkılarından dolayı çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Li A, McKenna GJ, Boden HP, et al. A role of sunlight in skin cancer. UV induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 1124-8.
2. Nagano T, Ueda M, Ichihashi M. Expression of p53 protein is an early event in ultraviolet light induced cutaneous squamous cell carcinogenesis. Arch Dermatol 1993; 129:1157-61.
3. Nakazawa H, English D, Randell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, et al. UV and skin cancer: Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:360-4.
4. Nadal A, Jares P, Cazorla M, Fernandez PL, Sanjuan X, Hernandez L, et al. p21 expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. J Pathol 1997; 183:156-63.
5. Sjalander A, Birgander R, Rannug A, Alexandrie AK, Tornling G, Beckman G, et al. Association between the p21 codon 31 A1 (arg) allele and lung cancer. Hum Hered 1996; 46:221-5.
6. Forman AB, Roenigk HH, Caro WA, Magid ML. Long-term follow-up of skin cancer in PUVA-48 cooperative study. Arch Dermatol 1989; 125:515-19.
7. Proby CM, du Peloux Menage H, McGregor JM, Hobbs C, Norris PG, Smith N, et al. p53 immunoreactivity in cutaneous PUVA tumors is similar to that in other non-melanoma skin neoplasms. J Cutan Pathol. 1993; 20:435-41.
8. Stern RS, Laird N and members of the photochemotherapy follow-up study: The carcinogenic risk of treatments for severe psoriasis. Cancer. 1994; 73:2759-64.
9. Baas IO, Mulder JWR, Offerhaus JA, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. J Pathol 1994; 172:5-12.
10. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV irradiated normal human skin. Oncogene 1993; 8:203-7.
11. Nataraj AJ, Black HS, Ananthswamy HN. Signature p53 mutations at DNA cross-linking sites in 8-methoxypsoralen and ultraviolet A (PUVA)-induced murine skin cancers. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:7961-5.
12. Nataraj AJ, Wolf P, Cerroni L, Ananthaswamy HN. p53 mutations in squamous cell carcinomas from psoriasis patients treated with psoralen+UVA(PUVA): relative frequency of PUVA versus UV signature mutations. J Invest Dermatol. 1997; 109:238-43.
13. Tron VA, Tang L, Yong WP, Trotter MJ. Differentiation associated overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in human cutaneous squamous cell carcinoma. Am J Pathol 1996; 149:1139-46.
14. O'Grady A, Kay EW, McKenna DB, Bennett MA, Murphy GM, Leader MB. Altered expression of the p53-regulated proteins, p21Waf1/Cip1, mdm2 and bax in ultraviolet-irradiated human skin. Hum Pathol 1998; 29:559-64.