

# Psoriatik Epidermiste Keratinosit Apoptozisi Azalmıştır

## *Keratinocyte Apoptosis is Decreased in Psoriatic Epidermis*

Semih Tatlıcan, Ata Türker Arıkök\*, Özlem Gülbahar\*\*,  
Cemile Eren, Zeliha Ulukaradağ, Fatma Eskioğlu

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, Ankara

\*Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2. Patoloji Kliniği, Ankara

\*\*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

### Özet

**Amaç:** Keratinositlerin hiperproliferasyonu ve anormal diferensiyasyonu psoriasis vulgarisin temel özellikleridir. Psoriasis vulgaris keratinosit apoptozisinin azaldığı bir hastalık olarak kabul edilse de; sonuçlar birbiriyle çelişmektedir. Bu çalışmanın amacı kalınlaşmış bir epidermin oluşmasında artmış keratinosit proliferasyonu yanında azalmış keratinosit apoptozisinin de rol alıp almadığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya 43 tedavi edilmemiş psoriasis vulgaris hastası ve 20 sağlıklı kontrol bireyi dahil edildi. Katılımcılardan alınan biyopsi örnekleri; keratinosit proliferasyonunu göstermek amacıyla Ki-67 ekspresyonları için immünohistokimyasal boyama ile ve keratinosit apoptozisini göstermek amacıyla terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT)-aracılı dUTP-biotin çentik-uç etiketleme (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling, TUNEL) yöntemi ile değerlendirildi.

**Bulgular:** Apoptotik indeks (TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesi) psoriatik epidermiste (0,33±0,64) normal epidermisten (0,75±0,85) belirgin olarak daha düşük iken (p=0,021), Ki-67 indeksi (Ki-67 için pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi) psoriatik epidermiste (30,86±10,49) normal epidermisten (11,65±2,98) belirgin olarak daha yüksekti (p=0,00).

**Sonuç:** Azalmış keratinosit apoptozisi de artmış keratinosit proliferasyonu gibi psoriasisteki artmış epidermal kalınlığa katkıda bulunur. (*Türkderm 2009; 43: 167-70*)

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, hücre proliferasyonu, psoriasis

### Summary

**Background and Design:** Abnormal differentiation and hyperproliferation of keratinocytes are the hallmarks of psoriasis vulgaris. Although psoriasis vulgaris is generally accepted as a disease of decreased keratinocyte apoptosis, the results are contradictory. The aim of the current study is to investigate whether decreased keratinocyte apoptosis contributes to the formation of a thickened epidermis as increased keratinocyte proliferation.

**Material and Method:** Forty-three untreated psoriasis vulgaris patients and 20 healthy control subjects were included into the study. Biopsy specimens taken from the enrollee were evaluated by immunohistochemical staining for Ki-67 expressions to show the proliferation of keratinocytes and by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) method to show the apoptotic keratinocytes.

**Results:** Apoptotic index (percentage of the TUNEL positive cells) was significantly lower in psoriatic epidermis (0.33±0.64) than in normal epidermis (0.75±0.85); whereas Ki-67 index (percentage of positively staining cells for Ki-67) was significantly higher in psoriatic epidermis (30.86±10.49) than in normal epidermis (11.65±2.98), (p=0.021 and p=0.00; respectively).

**Conclusion:** Decreased keratinocyte apoptosis also contribute to increased epidermal thickness in psoriasis as well as increased keratinocyte proliferation. (*Turkderm 2009; 43: 167-70*)

**Key Words:** Apoptosis, cell proliferation, psoriasis

**Yazışma Adresi/Address for Correspondence:** Dr. Semih Tatlıcan, Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, Ankara, Türkiye Tel.: +90 312 418 48 58-312 596 30 28 E-posta: semihatatlican@gmail.com

**Geliş Tarihi/Received:** 19.05.2009 **Kabul Tarihi/Accepted:** 17.06.2009

*Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi, Galenos Yayıncılık tarafından basılmıştır. Her hakkı saklıdır.  
Turkderm-Archives of the Turkish Dermatology and Venerology, published by Galenos Publishing. All rights reserved.*



## Giriş

Psoriasis vulgaris (PV) epidermiste hiperproliferasyon ve diferensiyasyon bozukluğu ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır<sup>1</sup>.

Keratinosit apoptozisi epidermal gelişmenin ve homeostazın düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir<sup>2</sup>. Spontan keratinosit apoptozisinde azalma ve uyarılmış keratinosit apoptozisine direnç psoriasisste görülen epidermal kalınlaşma için ileri sürülen mekanizmalar arasındadır<sup>2</sup>.

PV hastalarının deri biyopsilerinde hücre kinetiğini araştırmak amacıyla keratinosit proliferasyonu ve apoptozisinin birlikte araştırıldığı az sayıda çalışma mevcuttur; Bu çalışmalarda keratinosit proliferasyonu artmış olarak bulunurken, keratinosit apoptozisi ile ilgili sonuçlar birbirleriyle çelişmektedir<sup>3-10</sup>.

Çalışmaların bir kısmında apoptotik boyanma artmış<sup>3,4,9</sup> olarak bulunurken; bir kısmında ise azalmış<sup>5-8</sup> olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada oldukça geniş sayıda ve sistemik tedavi almamış PV hastasından elde edilen deri biyopsilerinde keratinosit proliferasyonu ve apoptozisi değerlendirilerek hücre kinetiğindeki değişikliklerin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Çalışma Grupları

Çalışma 23 kadın ve 20 erkek kronik plak tip psoriasis hastası ile herhangi bir deri hastalığı bulunmayan 20 bireyden elde edilen deri biyopsi örnekleriyle gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen hastalar daha önce hiçbir sistemik tedavi almamışlardı. Topikal tedavi alan hastalarda da deri örneği alınmadan 1 ay öncesinde bu topikal tedaviler kesildi. Dahili veya deri kanseri olan; püstüler, guttat, eritrodermik veya invers psoriasis olan ve başka bir nedenle sistemik veya topikal tedavi alan kişiler çalışmaya dahil edilmedi. Çalışma protokolünün hastane etik kurulu tarafından onaylanmasından sonra tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam formları alındı. PV tanısı klinik ve histopatolojik olarak konuldu. Hastalar klinik olarak "Psoriasis Area and Severity Index" (PASI) skoru ile değerlendirildi.

### Deri Örneklerinin Toplanması

Çalışmada klinik olarak PV tanısı alan 43 hastanın gövdesinden (normal olarak güneş görmeyen bir bölge olduğu için tercih edildi) "punch" biyopsi örnekleri alındı. Kontrol deri biyopsileri herhangi bir deri hastalığı, deri kanseri veya sistemik kanseri bulunmayan hastalara ait deri örneklerinden oluştu.

"Punch" biyopsi örnekleri formaldehitte fikse edildikten sonra parafine gömülerek işleme alındı. Hematoksilin ve eozin boyası ile PV tanısı histopatolojik olarak kesinleştirildikten sonra immünohistokimya ile Ki-67 ve terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)-aracılı dUTP-biotin çentik-uç etiketleme (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling, TUNEL) yöntemi ile apoptozis değerlendirildi.

### Tunel Metodu

Apoptozisin tespit edilebilmesi için TUNEL yöntemi kullanıldı. Bunun için bir ApopTag kiti (Chemicon, ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, S7101) üreticinin önerdiği protokole göre uygulandı. Kısaca parafin kesitler ksilol ile deparafinize edildi, 20µg/ml proteinaz K ile 15 dakika inkübe edildi.

Endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile bloke edildi. Dengeleyici tampon ile 10 saniye ve TdT enzim ile 37°C'lik etüvde 1 saat inkübe edildi. Sonra sırasıyla anti-digoxigenin peroksidaz ve peroksidaz substrat ile işleme devam edildi. Aralarda Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (Phosphate Buffer Saline, PBS) ile yıkandı. Zıt boya olarak metil yeşili kullanıldı. Lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. TUNEL için sadece koyu kahverengi nükleer boyamalar pozitif kabul edildi.

### İmmünohistokimyasal Boyama

Formalinle fikse, parafine gömülü dokulardan 4 mikrometrelik kesitler alındı. Ksilol ile deparafinize edildikten sonra etanol ile dehidrate edildi. Antijen geri kazanımı için mikrodalgada sitrat ile 20 dakika işleme alındıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 10 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkandı ve protein blokaj sonrasında primer antikor Ki-67 (Novocastra, klon MM1) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Devamında sırasıyla sekonder antikor, streptavidin peroksidaz kompleksi ve renklendirmek için %0,1'lik diaminobenzidin ile işleme devam edildi ve her birinin arasında PBS ile yıkandı. Zıt boya için mayer hematoksilen kullanıldı ve dehidratasyon ve berraklaştırma sonrasında lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Nükleer boyamalar pozitif kabul edildi.

### Sonuçların Değerlendirilmesi

Ki-67 ve apoptozis indeksleri boyanma görülen 3 farklı alanda da 100 hücre sayılarak; toplam pozitif hücre sayısının toplam hücre sayısına (300) bölünmesi ile elde edilen ve yüzde ile ifade edilen değerlerdir.

### İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiki analizinde SPSS for Windows 15 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Sürekli değişkenler ortalama±standart sapma ve kategorik değişkenler yüzde ile ifade edildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilks testi ile incelendi. Normal dağılan değişkenler için gruplar arasındaki farklılıklar t testi veya Mann Whitney U testi ile incelendi. Anlamlılık değeri 0,05 olarak kabul edildi.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen hasta (ortalama yaş: 38,98±13,50, 23 (%53,48) kadın ve 20 (%46,52) erkek) ve kontrol grubunun (ortalama yaş: 37,05±13,10, 7 (%35) kadın ve 13 (%65) erkek) yaş (p=0,597; t testi) ve cinsiyet (p=0,273; Ki kare testi) dağılımları benzerdi.

### Apoptotik İndeks

Normal deri örneklerinde az sayıda apoptotik hücreye rastlanırken, psoriatik deri örneklerinde çok daha az sayıda apoptotik hücre tespit edildi. Psoriatik derideki ortalama apoptotik indeks (0,33±0,64), normal derideki ortalama apoptotik indeksten (0,75±0,85) istatistiki olarak anlamlı derecede düşüktü (0,021; Mann Whitney U testi), (Resim 1,2).

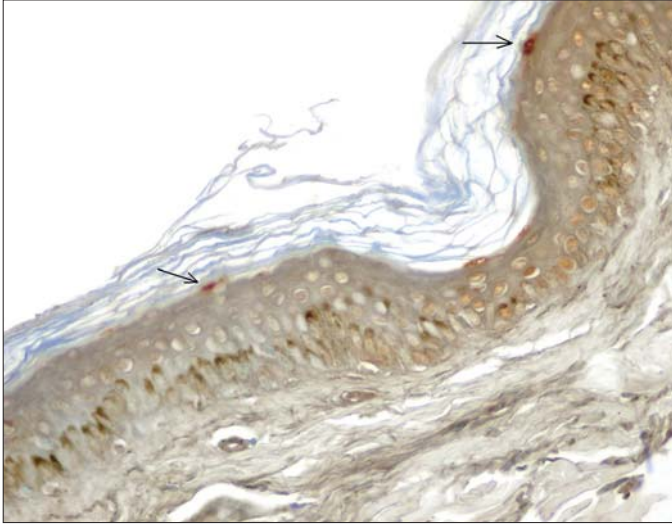
### Ki-67 İndeksi

Hasta grubuna ait psoriatik deri örneklerindeki ortalama Ki-67 indeksi (30,86±10,49) kontrol grubuna ait normal deri örneklerindeki ortalama Ki-67 indeksinden (11,65±2,98) istatistiki olarak anlamlı derecede yüksekti (P=0,00; t testi), (Resim 3,4).

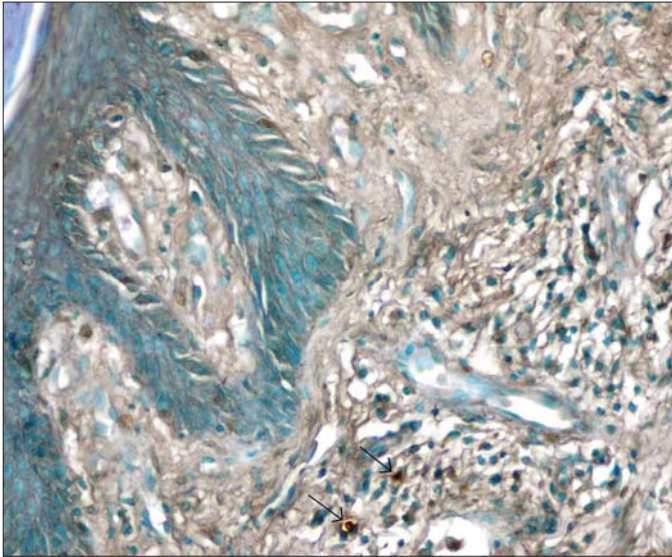
## Tartışma

Keratinositlerde anormal diferensiyasyon ile birlikte hiperproliferasyon, dermal ve epidermal inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve dermal damarlarda genişleme psoriasisin karakteristik özellikleridir<sup>1</sup>. Psoriasisin öncelikle bir keratinosit bozukluğu olmayıp; T lenfositler ve antijen sunucu hücreler ile keratinositler arasındaki karmaşık ilişkiler sonucunda keratinositlerde anormal diferensiyasyon ve hiperproliferasyona bağlı olarak epidermal kalınlaşma ile karakterize klinik görünümün ortaya çıktığı bilinmektedir<sup>1,2</sup>.

Keratinosit apoptozisi normal epidermal kalınlığı korumak için proliferasyonu dengeler<sup>2</sup>. Psoriasis hücre ölümü ile yaşamı arasındaki apoptotik dengenin hücre ölümü aleyhine bozulduğu hastalıklar arasında yer almaktadır<sup>2</sup>.



Resim 1. Kontrol olgusu, granüler tabaka içinde 2 adet apoptotik hücre mevcut (oklar), (TUNEL metodu, X400 büyütme)

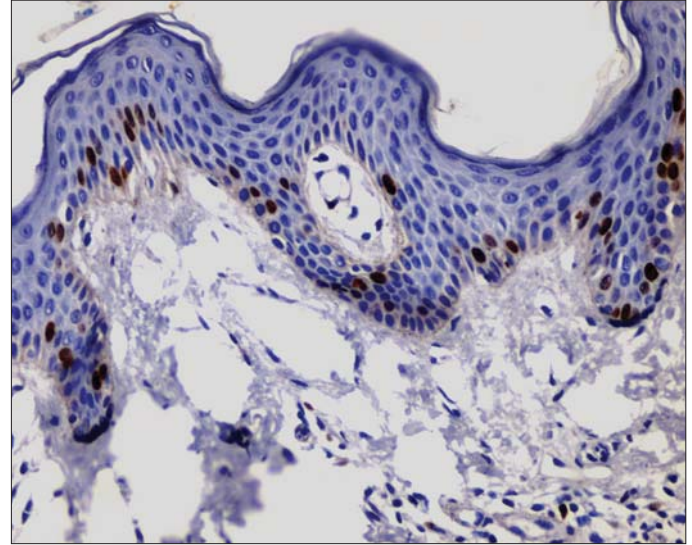


Resim 2. Psoriasis olgusu, epidermiste apoptotik hücre yok. Dermiste 2 adet apoptotik lenfosit mevcut. Nükleusta koyu kahverengi boyanma yanı sıra piknozis mevcut (TUNEL metodu, X400 büyütme)

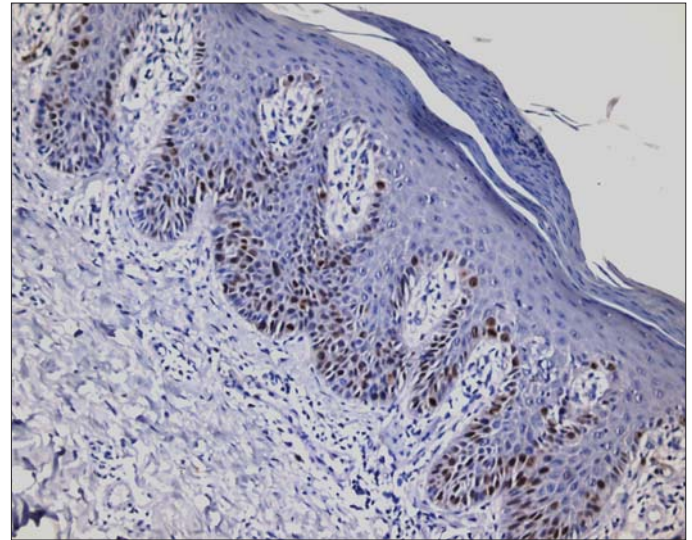
Laporte ve ark<sup>5</sup>. psoriatik epidermisteki germinatif tabakada normal epidermisteki germinatif tabakaya oranla apoptozisin belirgin derecede azaldığını ve regresyondaki psoriasisde ise arttığını göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada da psoriatik keratinositlerin metil selüloz ile uyarılan apoptozise karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir<sup>9</sup>. Castellijns ve ark tarafından<sup>6-8</sup> kalsipotriol, klobetazol-17-propionat ve takalsitolün psoriatik deriye olan etkilerinin araştırıldığı bir dizi çalışmada da epiderminin tüm katlarında çok az sayıda apoptotik hücre tespit edilmiştir.

Aynı yöntem ile yapılan biri retrospektif diğer iki çalışmada ise TUNEL boyanma pozitifliği psoriatik epidermiste artmış olarak bulunmuştur<sup>3,4</sup>. Buna rağmen apoptotik boyanma indeksinin yüksek çıkması apoptozisin arttığı yönünde değerlendirilmemiş aksine TUNEL pozitifliğinin çoğalan hücrelerin sayısındaki artıştan kaynaklandığı yönünde yorumlanmıştır<sup>3,4</sup>.



Resim 3. Kontrol olgusu, Ki-67 pozitif hücreler bazal tabakada mevcut (immünohistokimyasal boyama, X400)



Resim 4. Psoriasis hastasında epidermiste bazal ve suprabazal bölgede çok sayıda Ki-67 pozitif hücre mevcut (immünohistokimyasal boyama, X400)

Bu çalışmaların tamamında Ki-67 indeksi psoriatik deride anlamlı oranda yüksek bulunmuştur<sup>3-10</sup>. Ki-67 monoklonal bir antikor ile tespit edilen ve hücre proliferasyonunu göstermek için kullanılan bir nükleer proteindir<sup>11</sup>.

Psoriasis patogenezinde keratinosit apoptozisinin rolüne ilişkin apoptotik dengenin bozulduğunu gösteren ve tedavi ile apoptoziste artış olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır<sup>12-15</sup>. Keratinositlerde survivin ekspresyonunda artış<sup>12,13</sup>, Bcl-xL ekspresyonunda artış<sup>14</sup> ve interlökin (IL)-15 düzeylerinde artış<sup>15</sup> psoriasisde apoptozisin azaldığı yönündeki bulgular arasındadır<sup>12-15</sup>. Psoriasis tedavisinde etkili olduğu bilinen PUVA<sup>5</sup>, infliksimab<sup>13,16</sup> ve metotreksatin<sup>17</sup> antiinflamatuvar etkileri yanında keratinosit apoptozisini uyarak da etki gösterdikleri ifade edilmiştir<sup>5,13,16,17</sup>. Bizim çalışmamızda psoriatik epidermiste normal deriye kıyasla Ki-67 indeksi anlamlı derecede yüksek ve apoptotik indeks anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ki-67 indeksinin yüksek ve apoptotik indeksin düşük olması artmış keratinosit proliferasyonu kadar azalmış keratinosit apoptozisinin de psoriasis patogenezinde rolü olduğunu düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Ergun T: Psoriasisın etyopatogenezi. *Türkderm* 2008; 42 Özel Sayı 2:18-22.
2. Raj D, Brash DE, Grossman D: Keratinocyte apoptosis in epidermal development and disease. *J Invest Dermatol.* 2006; 126: 243-57.
3. Doger FK, Dikicioglu E, Ergin F et al: Nature of cell kinetics in psoriatic epidermis. *J Cutan Pathol* 2007;34:257-63.
4. Kawashima K, Do H, Ito Y et al: Evaluation of cell death and proliferation in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci* 2004;35:207-14.
5. Laporte M, Galand P, Fokan D et al: Apoptosis in established and healing psoriasis. *Dermatology* 2000;200:314-6.
6. Castelijns FA, Gerritsen MJ, van Erp PE et al: Efficacy of calcipotriol ointment applied under hydrocolloid occlusion in psoriasis. *Dermatology* 2000;200:25-30.
7. Castelijns FA, Gerritsen MJ, van Vlijmen-Willems IM et al: The epidermal phenotype during initiation of the psoriatic lesion in the symptomless margin of relapsing psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1999 40:901-9.
8. Castelijns FA, Gerritsen MJ, van Vlijmen-Willems IM et al: Proliferation is the main epidermal target in the treatment of psoriatic plaques with once daily application of tacalcitol ointment. *Acta Derm Venereol* 1999;79:111-4.
9. Wrone-Smith T, Mitra RS, Thompson CB et al: Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol* 1997;151:1321-9.
10. Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT et al: Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. *J Exp Med* 1995;182:2057-68.
11. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C et al: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-22.
12. Abdou AG, Hanout HM. Evaluation of survivin and NF-kappaB in psoriasis, an immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 2008; 35:445-51.
13. Markham T, Mathews C, Rogers S et al. Downregulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin in keratinocytes and endothelial cells in psoriasis skin following infliximab therapy. *Br J Dermatol* 2006;155:1191-6.
14. Fukuya Y, Higaki M, Higaki Y et al. Effect of vitamin D3 on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2002;293:620-5.
15. Rückert R, Asadullah K, Seifert M et al. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol* 2000;165:2240-50.
16. Krüger-Krasagakis S, Galanopoulos VK, Giannikaki L et al. Programmed cell death of keratinocytes in infliximab-treated plaque-type psoriasis. *Br J Dermatol* 2006;154:460-6.
17. Heenen M, Laporte M, Noel JC et al. Methotrexate induces apoptotic cell death in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998; 90:240-5.