Psoriasis Vulgaris ve Epidermoid Karsinom Hücre Proliferasyon Aktivitelerinin AgNORs Yöntemi ve Proliferating Cell Nuclear Antigen Ekspresyonu ile Karşılaştırılması*

Dr. Deniz Seçkin[1], Dr. Şükrü O. Özdamar[2], Dr. Filiz Karagöz[2], Dr. Ahmet Y. Turanlı[1], Dr. Bedri Kandemir[2]

ÖZET

DNA replikasyonu için gerekli bir nükleer protein olan Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında eksprese olur ve immünreaktivitesinin çeşitli neoplazmlardaki hücrelerin proliferasyon profili ile ilişkisi gösterilmiştir. AgNOR yöntemi de çeşitli kütanöz tümörlerde benign ve malign formların birbirinden ayrımında kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı bir benign proliferatif deri hastalığı olan psoriasis vulgaris ile bir malign kütanöz neoplazm olan epidermoid karsinomun hücre proliferasyon karakterlerini karşılaştırmaktı.

PCNA immünreaktivitesi (biotin-streptavidin peroksidaz metodu; clone: P10) ve AgNOR yöntemi 14 psoriasis vulgaris ve 10 kütanöz epidermoid karsinom olgusunda incelendi. PCNA indeksi (nükleer pozitive gösteren hücreler /1000 hücre), epidermoid karsinomlarda [(0.647±0.083 (ortalama±st. hata)] psoriasis vulgaris olgularına [(0.071±0.032 (ortalama±st. hata)] oranla önemli derecede yüksekti ($p<0.001$). AgNOR değerleri de bu lezyonlarda sırasıyla (3.920±0.323/nükleus) ve (2.180±0.173/nükleus) olarak saptandı. İki grup arasındaki fark anlamlı bulundu($p<0.001$).

Psoriasis vulgaris'de belirgin epidermal proliferasyon varlığı gösterildi. Hiperproliferatif aktivitenin epidermoid karsinomlarda çok daha yüksek olduğu ve ayrıca PCNA ve AgNOR reaksiyonlarının çeşitli hiperproliferatif deri lezyonlarının biyolojik davranışlarının incelenmesinde yararlı olabilecekleri ortaya kondu.

Anahtar Kelimeler : Psoriasis vulgaris, Epidermoid karsinom, AgNOR, Proliferating cell nuclear antigen

SUMMARY

Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA), is a nuclear protein and is essential for DNA replication. It is expressed in late G1 and S phase with a maximum in the S phase of the cell cycle. PCNA immunoreactivity correlates with the proliferative state of the cell in various neoplasms. Staining of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) is a histological technique assayed on a wast array of cutaneous tumors in order to help distinguish benign from malignant lesions. The aim of this study was to compare the cell proliferation characteristics in psoriasis, a benign hyperproliferative skin disease, and in squamous cell carcinoma (SCC), a malignant cutaneous neoplasm.

In order to evaluat proliferative activity, PCNA immunoreactivity (clone: P10) using streptavidin biotin peroxidase method and AgNOR staining were investigated in biopsy specimens of 14 cases of psoriasis and 10 cases of SCC. The PCNA index (number of positive cells/ 1000) in SCC [(0.647±0.083 (mean±SE)] was significantly higher than in psoriasis [(0.071±0.032(mean ±SE)] ($p<0.001$). The AgNORs counts were 3.92 ± 0.323 / nucleus and 2.18±0.173/nucleus in SCC and psoriasis, respectively ($p<0.001$).

In conclusion, although psoriasis is a disease of marked epidermal hyperproliferation, hyperproliferative state is much more marked in SCC. Secondly, analysis of PCNA and AgNOR may be useful for examining biologic features in various hyperproliferative skin diseases.

Key Words : Psoriasis vulgaris, squamous cell carcinoma, AgNORS, Proliferating cell nuclear antigen

1 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji ABD
2 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD

* Bu çalışma 12-15 ekim 1996 tarihleri arasında ANKARA'da yapılan XII. Ulusal Patoloji Kongresi"nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Psoriazis, toplumda en sık görülen kronik inflamatuar dermatozlardan biridir. Sadece ABD'de 20 milyon hastanın bulunduğu bildirilmiştir. Remisyon ve alevlenmeler ile giden ve çoğu kez tedaviye dirençli olan bu hastalık, genellikle büyük eklemlerin ekstansör bölgelerinde, skalp, tırnak ve genital bölgede yerleşen, keskin sınırlı, eritemli, skuamlı, plak ve/veya maküler lezyonlar ile karakterlidir. Patogenezinde epidermal hücre proliferasyonundaki hızlanmanın yanısıra keratinosit diferansiyasyonunda da bozulma sözkonusudur. Bazal tabaka hücrelerinin mitotik aktiviteleri ve DNA sentezleri normalden 6-8 kat yüksektir[1,3].

Malign tümör hücrelerinin benign proliferatif lezyon hücrelerine oranla daha yüksek proliferasyon hızları gösterdikleri bilinmektedir. Grade I epidermoid karsinom hücrelerinin, grade III tümör hücrelerine oranla daha düşük hızla çoğaldıkları bilinir[4,5].

AgNOR yöntemi, rRNA segmentlerine bazı nükleolar asidik fosfoproteinlerin incelenmesini sağlar. Metabolik ve proliferatif aktivite farklılıkları gösteren hücreler arasında AgNOR sayı ve dağılımı farklı bulunur. Çeşitli kütanoz tümörlerde benign ve malign formların birbirinden ayrımında da kullanılmaktadır[4,5,7].

DNA replikasyonu için gerekli bir nükleer protein olan Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında eksprese olur ve immünreaktivitesinin çeşitli neoplazmlardaki hücrelerin proliferasyon profili ile ilişkisi gösterilmiştir[6,12].

Bu çalışmada, derinin çok sık görülen ve kendi kendini sınırlayan bir hiperproliferasyon karakterine sahip benign bir hastalığı olan psoriasis vulgaris ile malign kütanöz neoplazm epidermoid karsinomun hücre proliferasyon karakterleri, AgNOR profillerinin ve PCNA ekspresyonunun incelenmesi yoluyla karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

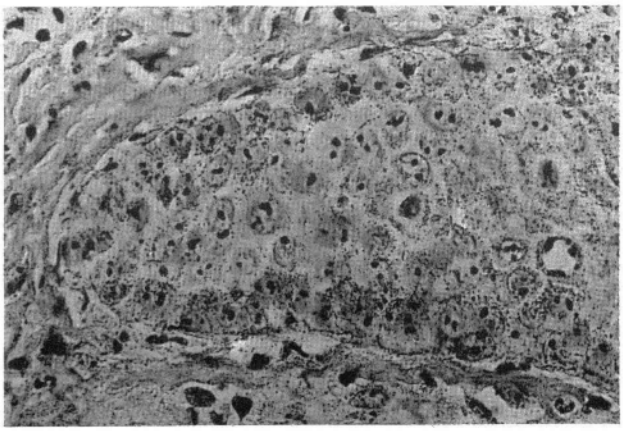
Çalışmamız 1993-1995 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konan 14 psoriasis vulgaris ve 10 kütanöz epidermoid karsinom olgusunu (grade 1: 4, grade II: 3, grade III: 2 ve grade IV: 1 olgu) kapsamaktadır. Aktif dönemde alınan lezyonel psoriasis vulgaris; kontrol amacıyla kullanılan karsinom olguları materyallerinden elde edelin cerrahi sınır sağlam epidermis dokuları ve epidermoid karsinom doku örnekleri parafin kesitlerinin bir bölümünde AgNORs için kolloidal gümüş boyama metodu uygulanmıştır. Kesitler gelatin/formik asit-gümüş nitrat solüsyonu ile karanlıkta 1 saat muamele edilmiştir. AgNOR skoru (AS); her vakada 100 tümör hücresi nükleusunda AgNOR benekleri sayılarak, nükleus başına düşen ortalama değer alınarak hesaplanmıştır(x1000, imm. oil). Diğer bölüm kesitlerde de streptavidin biotin perosidaz (HistostainSP kit, Zymed, USA) yöntemi kullanılarak anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (clone: P10, Zymed, USA) varlığı araştırılmış ve PCNA indeksi (Pİ) hesaplanmıştır (nükleer pozitivite gösteren hücreler/1000 neoplastik hücre). Elde edilen değerler SPSS (v: 5.0) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

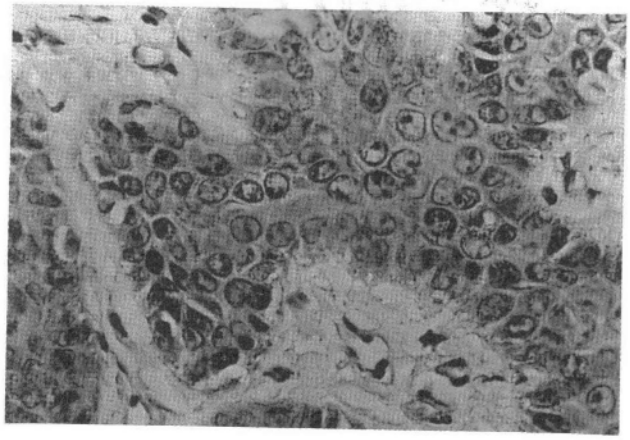
Kontrol epidermis dokularında AgNORs değerleri 1.233 ile 1.684 arasındaydı [(1.361±0.096/nükleus (ortalama±st. hata)]; Dağılım bazal hücre tabakasındaki hücrelerde daha fazla gözleniyordu. Psoriasis vulgaris dokularında AgNORs bazal ve suprabazal hücre tabakasında daha belirgin olmak üzere tüm epidermis katlarındaki keratinositlerde kontrol dokulara oranla sayıca daha fazla olarak izlendi; AgNORs değerleri 1.612 ile 2.820 arasında olup [(2.180±0.173/nükleus (ortamala±st. Hata)] olarak saptandı.

PCNA bazal tabakada rastgele, düzensiz dağılım gösteriyordu. PCNA indeksi 0.007 ile 0.035 arasında değişiyordu [(0.014±0.002 (ortalama±st. hata)]; Stratum spinosum ve granulosum da reaksiyon izlenmedi. PCNA reaksiyonu psoriasis dokularında epitel bazal hücre tabakaları ve yakınlarında saptandı. İndeks değerleri 0.047 ve 0.091 arasındaydı [(0.071±0.032 (ortalama±st. hata)] Epidermoid karsinom olgularımızda iyi diferansiye alanlarda psoriasis ve kontrol epidermis dokularında gözlenen benzer bazal hücre tabakaları PCNA reaksiyonları gözlendi. Epidermoid karsinom olguları değerleri de 0.047 ile 0.975 arasındaydı. [(0.647±0.083 (ortalama±st. hata)] Ancak aynı dokuda diferansiyasyonun azalmış olduğu alanlarda ve/veya az diferansiye tümör dokuları hücrelerinde diffüz/yoğun immünreaksiyon izlendi. Karsinom grade'leri arasındaki farklar değerlendirilmedi ise de gerek AgNORs skorları gerekse PCNA indeksleri grade yükseldikçe artış gösteriyordu .

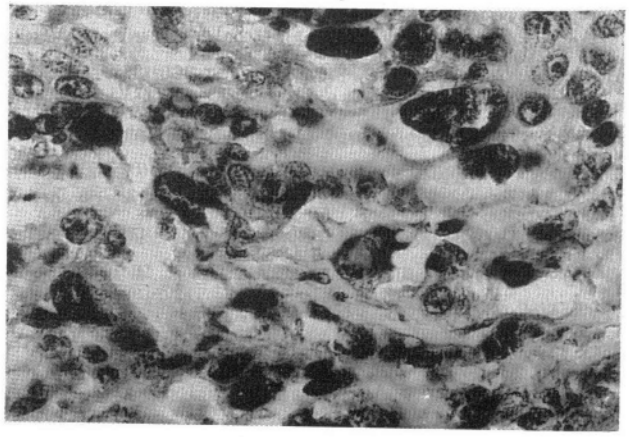
PCNA indeksi epidermoid karsinomlarda normal epidermis ve psoriasis vulgaris olgularına oranla önemli derecede yüksek bulundu($p<0.001$). AgNORs değerleri sınandığında da epidermoid karsinom grubu ile psoriasis vulgaris grubu



Resim 1 :Psoriasis vulgaris de AgNORS benekleri (x630 imm, oil, gümüşleme)



Resim 2 : Psoriasis vulgaris de PCNA immünreaksiyonu (x400, streptavidin-biotin peroksidaz)

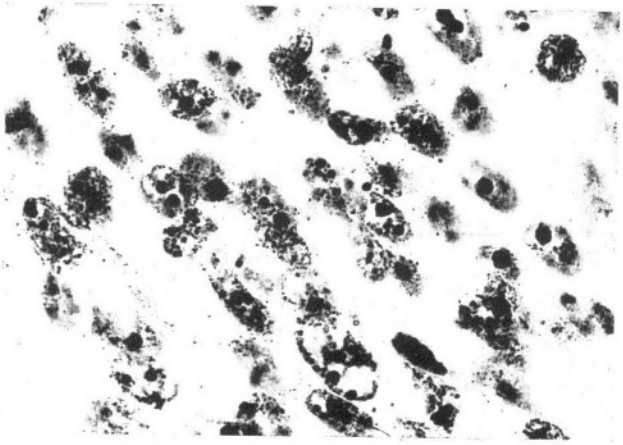


Resim 4 : Epidermoid karsinomda (grade III) PCNA immünreaksiyonu (x1000, imm. oil, streptavidin-biotin peroksidaz)

arasındaki fark anlamlı bulundu($p<0.001$).

TARTIŞMA

İnsan dokuları preparasyonlarında, çoğalan hücre populasyonlarının değerlendirilmesinde; mitotik figür sayımı, T3-timidin, BrdU, S-faz akım sitometri analizi, AgNORs gibi yöntemler yanısıra Ki-67, p105, p145, cyclin gen ailesi ürünleri, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gibi proliferasyon ile ilişkili proteinlerin expresyonunun gösterilmesi de kullanılmaktadır[4,6]. Ki-67 ve AgNORs ve akım sitometri analizi ile PCNA ve AgNORs; Ki-67, BrdU ve PCNA indeksleri arasındaki ilişkiler ortaya konmuştur[10-12]. Nucleolar organizer regions (NORs), rRNA üretimi için kodlanmıştır ve proliferatif aktivite farklılıkları gösteren hücreler arasında AgNORs sayı ve dağılımı farklıdır. Benign hücreler genellikle sıkı kümelenmiş AgNORs içeren düzgün bir nükleolusa; malign hücreler ise nükleus içinde dağınık çok sayıda AgNORs içeren birden fazla nükleolusa sahiptir[4,5,7,10,11].



Resim 3 :Epidermoid karsinomda (grade II) AgNORs benekleri (x1000, imm. oil, gümüşleme)

DNA polimeraz-delta yardımcı proteini olan PCNA (36 kd, p10) ekspresyonunun gösterilmesi, malign potansiyel ile reperatif/rejeneratif aktivite hakkında değerli bilgiler vermektedir. PCNA immünreaksiyonu; hücre replikasyonu ile ilişkili olarak artmasına, DNA onarımı sonucunda yeniden dağılımına ve/veya PCNA geninin az veya fazla ekprese edilmesine bağlı olabileceği gibi, düzen bozulan PCNA transkripsiyon veya translasyonu ile de ilişkili olabilir. PCNA mRNA'sını stabilize eden büyüme faktörleri salgılayan tümörlerde DNA sentezi uyarılmadan da PCNA birikimi olduğu gösterilmiştir[8,12]. Nükleus PCNA içeriği G1 başında başlar; S fazında maksimum düzeye ulaşır. Bu dönemler içerisinde PCNA immünreaksiyonu diffüz, yoğun, intranükleer karakterdedir ve maksimum DNA sentezine işaret eder[6]. Epidermis hücre çoğalmasının incelenmesi için iyi bir modeldir. Proliferasyon bazal ve supra bazal tabaka hücrelerinde olur. Terminal diferansiyasyon ise spinöz ve granüler tabakalarda gerçekleşir[2].

Epidermal gelişimin mekanizmalarında PCNA ekspresyonunun keratinosit proliferasyonundaki rolü gösterilmiştir[2]. Normal epidermisde PCNA bazal tabakada rastgele dağılım göstererek %5-30 hücrede izlenir[6]. Kuvvetli pozitivite nadirdir. Stratum spinozum ve granulozum tabakalarında genellikle negatif veya zayıf pozitivite gözlenir[6,13]. Ancak normal epidermis PCNA profilinin yaş, anatomik bölge ve güneş ışığına maruz kalma derecesi ile ilişkisi henüz açık değildir[6].

Psoriasis sık görülen kronik, inflamatuar bir deri hastalığıdır. Histopatolojik olarak hastalık epidermisde hiperproliferasyon, özellikle T lenfositler, monositler ve nötrofillerden oluşan iltihap hücrelerinin toplanmaları ve dermal papiller kan damarlarında artış ile karakterlidir. Keratinosit hiperproliferasyonu psoriazisin majör komponentidir. Normal epidermise oranla psoriazisde mitozlar çok daha sıktır ve keratinosit dönüşüm hızı 10 kattan fazladır. Hiperproliferasyonun gelişiminde bugün için protein kinaz C

aktivitesi değişikliği yanısıra T lenfositlerinden ve keratinositlerden salınan TGF-α, IL-6, IL-8 ve ICAM-1 sorumlu tutulur[1,3].

Lezyonel psoriatik epidermisde normal epidermisdekine benzer proliferatif hücre populasyonları bulunur. Ancak çok hızlı bir proliferasyon gösterdiği bilinen psoriazis aktif lezyonlarında hücrelerin çoğalması siklusdan siklusa geçen epidermal hücre proliferasyonu tarzında değildir. PCNA reaksiyonu S fazının uzamış olmasıyla ilişkili olarak epidermis hücrelerinin yaklaşık %10 ve 20'sinde izlenir. Psoriazisde izlenen PCNA reaksiyonu genellikle epitel bazal hücre tabakalarında ve bu tabaka yakınlarında saptanır. Lezyonel psoriasis vulgaris dokularında izlenen AgNORs profili, PCNA ekspresyonuna yakın bir karakter gösterir; AgNORs "dot"ları, bazal ve supra bazal tabaka hücrelerinde daha yoğun gözlenir[2,3,6].

Bildirilen çalışmalarda epidermoid karsinomda epidermis üst tabakalarında mitotik aktivitenin fazla olduğu ama aktif bölünmedeki hücre sayısının düşük olduğu, buna karşın PCNA reaksiyonunun yüksek olduğu saptanmıştır. AgNORs içinse böyle bir özellik saptanmamıştır, mitoz sayısı ve yüksek grade, AgNORs profilleri ile parallellik göstermektedir. Bu tümörlerde PCNA ekspresyonu sadece hücre bölünmesi ile ilgili olmayabilir. PCNA hücre bölünmesi için gerekli olabilir ancak yeterli olmayabilir[5,7,13].

PCNA ekspresyonları çeşitli keratinöz neoplazmlarda araştırılmıştır. Keratoakantomaların yaklaşık %80'inde özellikle epitel adacıkları periferinde daha çok bazal ve intermediate supra bazal hücre gruplarında immün reaksiyon izlenir. Verruca vulgarisde PCNA patterni epidermoid karsinomlar ile aynı, ancak daha hafiftir. Epidermoid karsinomların %80'inde reaksiyon yoğun ve diffüz/infiltratif karakterdedir, İmmün reaksiyon gösteren hücreler az keratinizasyon gösteren alanlarda daha fazladır. Diferansiyasyon ve atipi ile immün reaksiyon arasında direkt ilişki gösterilmiştir. Karsinomlardaki bu özellik klonal tümör gelişimi ile açıklanmaktadır, ancak grade'ler arası farklılıklar henüz aydınlatılamamıştır[6,13,14].

Sınırlı sayıda olgu içeren gruplarımızda benign ve malign epidermal proliferasyonların prolifere hücre populasyonları dağılımları incelendi. Epidermoid karsinom ile psoriasis vulgaris dokularında izlenen reaksiyon patternleri gerek AgNORs gerekse PCNA immün reaksiyonu açısından literatürde elde edilmiş olan sonuçlar ile uyumluluk gösteriyordu. Psoriasis vulgaris'de belirgin epidermal proliferasyon varlığı, ancak hiperproliferatif aktivitenin epidermoid karsinomlarda çok daha yüksek olduğu gösterildi. Epidermoid karsinom ile psoriasis vulgaris proliferasyon karakterlerinin birbirlerinden farklılıkları da ortaya kondu. Saptanan değerlerin tekrarlanabilirliğinin, kullanılan tekniklerin prognoza yönelik değerlerinin ayrıca benign ve malign proçesin gelişiminde aydınlatıcı özelliklerin ortaya konması için daha geniş olgu gruplarında çalışılması gerektiğine inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Barker JNWN. The pathophysiology of psoriasis. Lancet 1991; 338: 227-230.
2. Miyagawa S., Okada N., Takasaki Y., et al. Expression of Proliferating cell nuclear antigen/Cyclin in Human Keratinocytes. J Invest Dermatol 1989; 93: 678-681.
3. Bata-Csorgo Z., Hammerberg C., Voorhess JJ., Cooper KD. Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. J Exp Med 1993; 178: 1271-81.
4. Underwood JCE., Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol 1988; 155: 95-96.
5. Karitakis J., Hoyo E., Hermier C. Nucleolar organizer region enumeration in keratoacantoma and squamous cell carcinoma of the skin. Cancer 1992; 69: 2937-2941.
6. Geary WA., Cooper PH. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in common epidermal lesions. J Cutan Pathol 1992; 19: 458-468.
7. Howat AJ., Giri DD., Cottom DWK. Slater DN. Nucleolar organizer regions in Spitz naevi and malign melanomas. Cancer 1989; 63: 474-478.
8. Woosley JT., Dietrich DR. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. J Cutan Pathol 1993; 498-503.
9. Hall PA., Levison DA., Woods AL., et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 1990; 162: 285-294.
10. Dervan PA., Gilmartin LG., Loftus BN, et al. Argyrophilic nucleolar region (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. J Pathol 1989; 157: 307-313.
11. Giri DD., Nottingham JF., J. et al. Silver-binding nucleolar organizer regions count correlate with Ki 67. am J Clin Pathol 92: 162: 285-294.
12. Dierendonck CH van, Wijsman JH., Keijzer R. et al. Cell cycle related staining patterns of the anti-Proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Am J Pathol 1991; 138: 1165-1172.
13. Penneys NS., Boagert M., Serfiling U., Sisto M. PCNA expression in Cutaneous Kerationus Neoplasms and Verruca Vulgaris. Am J Pathol 1992; 141: 139-142.
14. Philips P., Helm KF. Proliferating cell nuclear antigen distribution in keratocantoma and squamous cell carcinoma. J Cutan Pathol 1993; 20: 424-428.