

# Psoriasis Lezyonlarında Ki-67, PCNA, bcl-2 ve p53 Protein Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi<sup>¶</sup>

## EVALUATION OF Ki-67, PCNA, bcl-2 AND p53 PROTEIN EXPRESSIONS IN PSORIATIC LESIONS WITH IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS

Emel BÜLBÜL BAŞKAN\*, Şükran TUNALI\*\*, Gülaydan FİLİZ\*\*\*, Kenan AYDOĞAN\*, Hayriye SARICAOĞLU\*\*\*\*

\* Uz.Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji AD,  
\*\* Prof.Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji AD,  
\*\*\* Uz.Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD,  
\*\*\*\* Doç.Dr., Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji AD, BURSA

### Özet

Psoriasis; T hücreleri ile keratinositler arasındaki etkileşim bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan ve keratinositlerde aşırı çoğalma ve apoptotik hücre ölümüne direnç ile karakterize, sık görülen bir dermatolojik rahatsızlıktır.

Psoriatik epidermiste hücre kinetiğini incelemek amacıyla yaptığımız çalışmamızda, generalize psoriasis tanısı konmuş 24 olgunun lezyonlarından ve 10 sağlıklı deriden punch biyopsi alındı. PCNA, Ki-67, p53 ve bcl-2 protein ekspresyonları avidin-biotin kompleks immunperoksidaz yöntemi ile gösterildi. PCNA, Ki-67, p53 ve bcl-2 protein ekspresyonları pozitif nükleer boyanan keratinosit yüzdeleri olarak hesaplandı.

Psoriatik keratinositlerde Ki-67 pozitif boyanan ortalama hücre sayısı %38.19, PCNA pozitif boyanan ortalama hücre sayısı %49.58, p53 pozitif boyanan ortalama hücre sayısı %11.5 bulunurken keratinositlerde bcl-2 ekspresyonuna nadiren rastlanıldı.

Sonuç olarak çalışmamızda psoriatik keratinositlerde artmış Ki-67 ve PCNA protein ekspresyonları hücre çoğalma kinetiğinin hızlandığını göstermektedir. Apoptozisi düzenleyen bir gen olan p53'ün de psoriatik keratinositlerde artış göstermesi, hızlı hücre çoğalması sırasında bu hücrelerde meydana gelebilecek DNA hasarlarını onarmak için fizyolojik bir reaksiyon olabilir.

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

T Klin Dermatoloji 2001, 11:68-72

### Summary

Psoriasis is a common dermatological disorder characterized by hyperproliferation and resistance of keratinocytes to apoptosis, possibly due to an abnormal regulation at the level of T cell-keratinocyte interaction.

In our study, punch biopsies were excised from lesional skin of 24 patients with generalized psoriasis and 10 healthy controls to search proliferation kinetics in psoriatic epidermis. The protein expression of PCNA, Ki-67, p53 and bcl-2 were demonstrated using the avidin-biotin complex immunoperoxidase method. The results of PCNA, Ki-67, p53 and bcl-2 protein expressions were evaluated for the percentage of positive keratinocyte nuclei in the epidermis.

While the mean percentage of Ki-67 positive cells in psoriatic epidermis was 38.19%, PCNA positive cells was 49.58% and p53 positive cells was 11.5%, we rarely observed bcl-2 positive staining keratinocytes.

In conclusion, increased protein expressions of PCNA and Ki-67 reflects increased proliferation kinetics in psoriatic epidermis. Induction of an apoptotic gene, p53, may be a physiologic reaction to repair the possible DNA errors occurring in the rapidly proliferating tissue.

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

T Klin J Dermatol 2001, 11:68-72

**Geliş Tarihi:** 28.07.2000

**Yazışma Adresi:** Dr.Emel BÜLBÜL BAŞKAN  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Dermatoloji AD, Görükle, 16059, BURSA

<sup>¶</sup> III. Çukurova Dermatoloji Günlerinde (1-3 Haziran 2000, Adana) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Psoriasis; aşırı fakat kontrollü hücre çoğalmasına enflamasyonun eşlik ettiği ve T hücreleri ile keratinositler arasındaki etkileşim bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıktığı varsayılan bir dermatolojik rahatsızlıktır (1,2). Hücre döngüsünde kısılma ve döngüye giren hücre sayısında artış

tespit edilmiş olmasına rağmen psoriatik keratinositlerdeki yüksek çoğalma aktivitesinin ve farklılaşma bozukluğunun sebebi tam olarak bilinmemektedir (3). Bununla beraber hücre büyümesi, farklılaşması ve ölümünden sorumlu olan genlerdeki değişikliklerin hücre çoğalmasını uyarma veya apoptozisi baskılama yoluyla psoriasis patogenezinde rol alması mümkün görünmektedir.

Bu genlerden biri olan bcl-2, hücre çoğalmasını uyardıktan sonra apoptozisi engellemesiyle özellikle gösteren bir gen dir (4,5). Normal deride bcl-2 proteini eksprese eden hücreler; bazal keratinositler, olgun kıl folikülünün üst üçte bir kısmı, sebace bezlerin terminal duktus kısmı ve ektrin bezlerdir (6). Keratinositler ve melanositlerin farklılaşmasına bağlı olarak bcl-2 proteininin ekspresyonu ve hücre oranı ters orantılı biçimde azalmaktadır (7).

Apoptozis ile ilişkili diğer bir gen olan p53 genom koruyucusu yani tümör baskılayıcısı ve apoptozis düzenleyicisi olarak görev alır ve DNA hasarı karşısında çoğalan hücreyi G1 evresinde durdurarak hasarlı hücrenin onarımına veya ölümüne olanak sağlar (8-10).

Günümüzde hücre çoğalmasını incelemek için en sık kullanılan antijenlerden biri Ki-67'dir (11). Ki-67 hücre döngüsünün G0 ve erken G1 evreleri dışındaki tüm evrelerinde eksprese edildiğinden dolayı bu nükleer antijene karşı monoklonal antikorlar kullanılarak çoğalma halinde olan hücreler tespit edilebilmektedir (12-14). Normal deride Ki-67 pozitif boyanan hücre oranı, %1-3 arasındadır ve daha çok bazal ve suprabazal tabakalarda gözlenmektedir (14).

Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ise, hücrenin çoğalma durumu ile ilişkili olarak görülen bir diğer nükleer proteindir. Geç G1 evresinden erken S evresine kadar ekspresyonu artmaktadır. Bu yüzden hücre çoğalması veya turnover oranının bir indeksi olduğu düşünülmektedir (15,16). Normal deride PCNA pozitifliğine sadece bazal tabakada ve ancak %10'a kadar varan oranlarda rastlanılmaktadır (17).

Biz de bu çalışmamızda psoriatik keratinositlerde hücre çoğalması ve ölümünü düzenleyen genlerin protein ekspresyonlarını inceleyerek psoriasis hücre kinetiğini irdelemeyi amaçladık.

## Materyel ve Metod

Çalışmamıza; Aralık 1998-Aralık 1999 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Dermatoloji Polikliniğine başvuran ve psoriasis tanısı konulan, son üç ay içerisinde sistemik veya topikal tedavi görmemiş, 13'ü (%54.2) kadın, 11'i erkek (%45.8), toplam 24 hasta alındı. Hastaların yaşları 23 ile 69 (ortalama 42.6 yıl) arasında, hastalık süreleri 2 yıl ile 40 yıl (ortalama 10.5 yıl) arasında değişmekteydi. Kontrol grubu olarak alınan 10 sağlam deri preparatı, psoriasis preparatları ile aynı şekilde boyanarak incelendi.

Hastaların infiltre plaklarından, alınan punch biyopsilerinde (5 mm.çap) hematoksilen&eoziin boyama ile histopatolojik incelenme sonucu psoriasis tanısı onaylandıktan sonra biyopsi kesitlerinde PCNA, Ki-67, bcl-2 ve p53 protein ekspresyonları avidin-biotin kompleks immunperoksidaz metodu ile şu antikorlar kullanılarak gösterilmiştir (DAKO Corp., U.S.A.): p53 proteininin vahşi ve mutant tipi ile reaksiyon veren bir monoklonal antikor olan DO7, Ki-S5 (Ki-67) ve 124 (bcl-2) monoklonal fare antikorları, sıçan monoklonal PNCA antikorunu olan PC10.

Biyopsi örnekleri %10 formalinde fikse edildikten sonra parafin kesitler poli-L-lizininli lamalara yerleştirilerek (Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA) bir saat 60°C'de inkübe edildi. Örnekler, sırasıyla ksilen ve alkolde bekletildi ve endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla beş dakika %3 hidrojen peroksitte ve ardından beş dakika fosfatla tamponlanmış salinde (PBS) uygulandı. Her işlem arasında preparatlar PBS içinde dikkatle yıkanmıştır. PCNA boyaması dışındaki preparatlar, 5 mM sitrat (ph=6.0) içinde 160 W mikrodalga fırında 99-100°C'de 20 dk. ısıtıldıktan sonra p53, bcl-2, Ki-67 ve PCNA monoklonal antikorları uygulanarak oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi. Preparatlara biotinylated anti-mouse antikorunu (Link solution, DAKO) damlatılarak 5 dk. inkübe edildikten sonra streptavidin (Peroksidaz Conjugated, DAKO) uygulanarak 30 dk. daha bekletildi. Kahverengi renk kromojen (diaminobenzidin) ile elde edilmiştir. PBS içinde yıkandıktan sonra preparatlara Harris hematoksilen ile zemin boyaması yapılmıştır. Havada kurumaya bırakılan preparatlar daha iyi incelemek amacıyla ksilenle şeffaflaştırılmıştır. Preparatlar, üzerine

Kanada balsamı ile lamel kapatıldıktan sonra x400 büyütmede incelenmiştir.

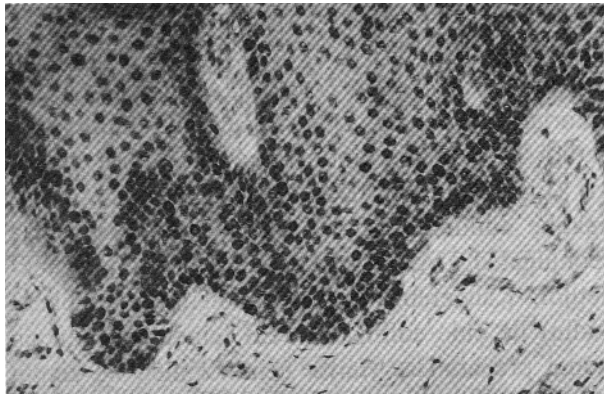
Bcl-2, Ki-67 and PCNA için pozitif kontroller beraberinde lenf nodunda çalışarak ve negatif kontroller de antikor uygulamadan boyanan kesitlerden elde edilmiştir. p53 boyaması için pozitif kontrol olarak daha önce pozitif olduğu gösterilmiş akciğer karsinoma kesitleri kullanılmıştır.

PCNA, Ki-67, bcl-2 ve p53 immunohistokimyasal boyamaları için rastgele seçilmiş dört ardışık epidermal alanda oftalmik mikrometre yardımı ile x400 büyütmede 1000 keratinosit sayılarak bunların içinde pozitif nükleer boyanma gösteren hücrelerin yüzde oranları alındı.

### Bulgular

Kontrol grubunun boyanma özellikleri literatür (6,7,12,15) ile uyumlu olarak tespit edildi (Tablo 1).

Lezyon yerinden alınan punch biyopsilerinin, Ki-67, PCNA ve p53 immunohistokimyasal boyama ile incelemesinde, pozitif nükleer boyanma gösteren hücreler daha çok epidermin bazal ve suprabazal tabakalarında gözlenirken dermal alandaki lenfositler ve bazal tabakada melanositler dışında bcl-2 pozitif nükleer boyanma gösteren keratinositlere rastlanılmadı (Şekil 1-4). Ortalama pozitif nükleer boyanma gösteren hücre sayısı Ki-67 proteini için %38.19, PCNA proteini için %49.58 ve p53 proteini için ise %11.51 idi (Tablo 2).



Şekil 1. PCNA pozitif nükleer boyanma gösteren keratinositler (x200 büyütme).

Tablo 1. Normal deride bcl-2, p53, Ki-67 ve PCNA ekspresyonu

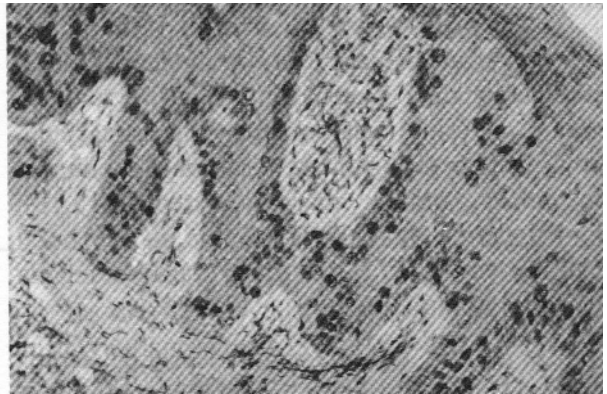
	Lokalizasyon	Görülme sıklığı
Bcl-2	bazal hücreler olgun kıl folikülünün üst üçte biri sebase bezlerin terminal duktusu ekrin bezler	Nadir
p53	bazal tabaka	Nadir
Ki-67	bazal ve suprabazal tabaka	%1-3
PCNA	bazal ve suprabazal tabaka	%10'a kadar

### Tartışma ve Sonuç

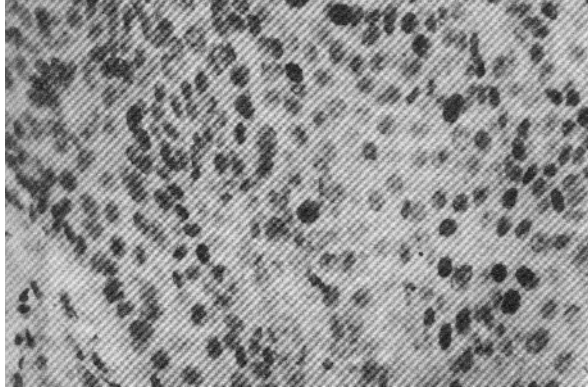
1963 yılında Van Scott ve Ekel (18) tarafından psoriatik plaklarda keratinosit hiperproliferasyonu-nun varlığının gösterilmesi ile araştırmalar psoriatik keratinositlerde hücre çoğalması ile ölümü arasındaki bozulan dengenin incelenmesine yoğunlaşmıştır (Tablo 3).

Bianchi ve ark. (19), psoriasiste apoptozisin ilişkisini irdelemek amacıyla lezyonlarda bcl-2 ekspresyonunu incelemiş ve bazal tabakadaki bcl-2 pozitif hücre oranında ciddi bir azalma tespit etmişlerdir. Nakagawa ve ark. ise (20) yaptıkları incelemede lezyonlarda nadiren boyanma gözlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da literatür (19-21) ile uyumlu olarak, psoriatik keratinositlerde bcl-2 boyanması saptamadık.

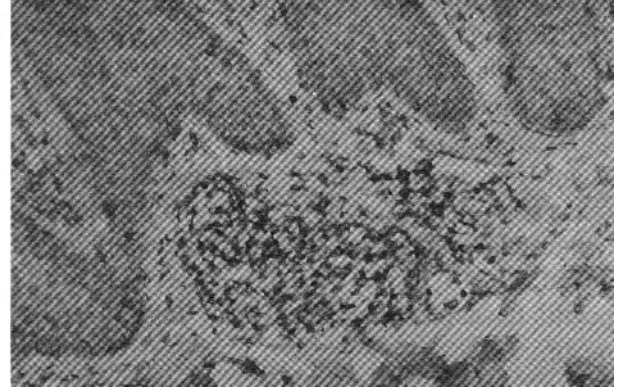
Psoriasis lezyonlarında p53 onkogen ekspresyonunun araştırıldığı çalışmalarda Tadini ve ark. (3), epidermiste özellikle bazal ve suprabazal



Şekil 2. Ki-67 pozitif nükleer boyanma gösteren ve daha çok bazal ve suprabazal yerleşimli keratinositler (x200 büyütme).



**Şekil 3.** p53 pozitif nükleer boyanma gösteren keratinositler (x400 büyütme).



**Şekil 4.** Epidermiste bcl-2 pozitif boyanan melanositler ve dermiste bcl-2 pozitif boyanma gösteren lenfositler (x200 büyütme).

tabakalarda yaklaşık %20 oranında pozitif boyanan hücre tespit etmişlerdir. Hannuksela-Svahn ve ark. (22) ise %1.4 oranında p53 pozitif boyanma göz-lemlemişlerdir. Çalışmamızda psoriasis lezyonlarında p53 pozitif boyanan hücre oranı ortalama %11.5 olup, bu oran Tadini ve ark.nın (3) bildirdikleri orandan daha düşük, Hannuksela-Svahn ve ark.nın (22) bildirdiği orandan çok daha yüksek idi. Oranlardaki bu değişikliklerin kullanılan boyama tekniklerine bağlı olabileceğini düşünüyoruz.

Ando ve ark. (23) çalışmalarında, Ki-67 monoklonal antikorunu kullanarak psoriatik epidermiste çoğalan hücreleri %54 oranında ve daha çok basal ve suprabazal tabakalarda tespit etmişlerdir. Soini ve ark. (24) ise, bu oranın %7-15 arasında değiştiğini bildirmişler, yine Caldwell ve ark. (14) bu oranı % 21.5 olarak saptamışlardır. Hannuksela-Svahn ve ark. (22) ise lezyonlu deride

**Tablo 2.** Psoriatik lezyonlarda 1000 keratinosit içinde pozitif nükleer boyanma gösteren ortalama hücre yüzdesi

	Pozitif nükleer boyanma gösteren hücre (%)
Ki-67	%38.19
PCNA	%49.58
p53	%11.5
bcl-2	Nadir

%16.6 oranında Ki-67 pozitif boyanma gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da literatürdekine (14, 22-24) benzer şekilde Ki-67 pozitif boyanma tespit edildi ve hücre oranı ortalama % 38.19 olarak bulundu. Bu oran, Ando ve ark. (23) ile Caldwell ve ark. (14) bildirdiği oranların arasında bir değerdir ve psoriasisde artmış olan

**Tablo 3.** Psoriasisde bcl-2, p53, Ki-67 ve PCNA protein ekspresyonları

	Bcl-2	p53	Ki-67	PCNA
Tadini ve ark. <sup>1989</sup>		%20		
Ando ve ark. <sup>1990</sup>			%54	
Bianchi ve ark. <sup>1994</sup>	Nadir			
Nakagawa ve ark. <sup>1994</sup>	Nadir			
Soini ve ark. <sup>1994</sup>			%7-15	
Caldwell ve ark. <sup>1997</sup>			%21.5	
Hannuksela-Svahn ve ark. <sup>1999</sup>		%1.4	%16.6	%48
Kawahira ve ark. <sup>1999</sup>				%24.2
Bülbül Başkan ve ark. <sup>2000</sup>	Nadir	%11.51	%38.19	%49.58

hücre kinetiğini doğrulamaktadır.

Kawahira'nın araştırmasında (17), PCNA pozitif boyanan hücre oranı %24.2 olarak saptarken, Hannuksela-Svahn ve ark. (22) ise %48 oranında PCNA pozitif boyanma gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da PCNA pozitif boyanan hücre oranı, Hannuksela-Svahn ve ark.'nın (22) bildirdiği orana çok yakın olarak %49.58 bulunmuştur. Hücre döngüsünde daha uzun süre eksprese edildiğinden dolayı, PCNA pozitif boyanan hücre oranı Ki-67 pozitif boyanan hücrelerden daha yüksek saptanmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda psoriatik keratinositlerde artmış hücre çoğalma kinetiğini yansıtır şekilde Ki-67 ve PCNA protein ekspresyonlarında artış olduğunu gözlemledik. Çoğalma göstergeleri gibi p53'ün de psoriatik keratinositlerde artış göstermesinin ise, hızlı hücre çoğalması sırasında bu hücrelerde meydana gelebilecek DNA hasarlarına karşı fizyolojik bir reaksiyon olabileceğini düşünüyoruz.

#### KAYNAKLAR

- Camp RDR. Psoriasis. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Bretznach SM, eds. Textbook of Dermatology. 6th ed. Oxford: Blackwell Science, 1998: 1589-1649.
- Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, eds. Dermatology in General Medicine. 5th ed. New York: McGraw Hill, 1999: 495-521.
- Tadini G, Cerri A, Crosti L, Cattoretto G, Berti E. P53 and oncogenes expression in psoriasis. Acta Derm Venereol (Stockh) 1989; Suppl. 146:33-5.
- Raskin CA. Apoptosis and cutaneous biology. J Am Acad Dermatol 1997; 36: 885-96.
- Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 1991; 65:1097-98.
- Lu QL, Poulosom R, Wong L, Hanby AM. Bcl-2 expression in adult and embryonic non-haematopoietic tissues. J Pathol 1993; 169:431-7.
- Sermadiras S, Dumas M, Joly-Berville R, Bonte F, Meybeck A, Ratinaud MH. Expression of bcl-2 and bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. Br J Dermatol 1997; 137: 883-9.
- Story M, Kodym R. Signal transduction during apoptosis: implications for cancer therapy. Frontiers in Bioscience 1998; 3: 365-75.
- Oskay T, Erdem C. Apoptoz ve dermatolojideki önemi. T Klin J Dermatol 2000; 10:213-21.
- Ekmekçi P, Anadolu R, Erdem C. P53 geni ve dermatolojideki önemi. T Klin J Dermatol 2000; 10:163-8.
- 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.
- Sawhney N, Hall PA. Ki-67-structure, function and new antibodies. J Pathol 1992; 168: 161-2.
- Smith MD, Healy E, Thompson V, Morley A, Rees JL. Use of in situ detection of histone mRNA in the assesment of epidermal proliferation: comparison with the Ki-67 antigen and BrdU incorporation. Br J Dermatol 1995; 132: 359-66.
- 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: 11-6.
- Quinn C, Wright N. The clinical assesment of proliferation and growth as prognostic variables. J Pathol 1990; 160: 93-102.
- Miyagawa S, Okada N, Yoshinari T, Iida T, Kitano Y, Yoshikawa K ve ark. Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocytes. J Invest Dermatol 1989; 93: 678-81.
- Kawahira K. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. Arch Dermatol Res 1999; 291: 413-8.
- Van Scott EJ, Ekel TM. Kinetics of hyperplasia in psoriasis. Arch Dermatol 1963; 88: 373-8.
- 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.
- Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. Cancer 1994; 74: 1720-4.
- 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.
- Hannuksela-Svahn 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: 195-9.
- 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.
- Soini Y, Paakkö P, Letho P, Oikarinen A, Vahakangas K. Aberrant accumulation of p53 associates with Ki-67 and mitotic count in benign skin lesions. Br J Dermatol 1994; 131: 514-20.