

Psöriazisli hastalarda deri lezyonlarında T hücreleri ve periferik kanda sitokin düzeyleri

T lymphocytes in the lesional skin and the levels of peripheral blood cytokines in patients with psoriasis

İbrahim Kökçam¹, Nursel Dilek¹, Ahmet Gödekmerdan², Nusret Akpolat³, Fulya İlhan²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 17.10.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 20.01.2011

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada kalsipotriol-betametazon dipropionat ile tedavi edilen plak psöriazisli olgularda doku düzeyinde hücresel immunitenin ve serumda sitokin düzeylerinin rolünün araştırılması amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya plak tip psöriazisli 20 olgu alındı. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası psöriatik lezyonları ile sağlam deriden biyopsi ve periferik kan örnekleri alındı.

Bulgular: İmmünohistokimyasal incelemede, CD4+, CD8+ ve CD25+ T lenfositler, tedavi öncesi lezyonlu dokuda sağlam doku ve tedavi sonrası doku ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde yüksekti (sırasıyla, $p<0.001$, $p=0.013$ ve $p<0.001$). Tedavi sonrası lezyonlu dokudaki CD4+ ve CD8+ ve CD25+ T lenfositler ise sağlam dokudan farklı değildi ($p>0.05$). IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ ve TGF- β 1 değerlerinde tedavi sonrasında tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler saptanmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda lezyonlu deride CD4+ ve CD8+ hücre birikimi olduğunu ve CD4+ T lenfositlerin daha hâkim hücre grubu olduğu gösterildi. Uygulanan topikal tedavinin etkinliğine paralel olarak lezyonlarda düzelme olması ve lezyonlu bölgelerde CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı bir azalma meydana gelmesi, Th lenfositlerin hastalığın immunopatogenezinde önemli rolünün olduğu tezini desteklemektedir. Ancak, sonuçlarımız, hastalığın kronik özelliği ile uyumlu olarak T hücrelerin dokuda yine de yeterince kaldığını ve topikal tedavinin hastalığın aktivasyonunu engellemediğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Psöriazis, patogenez, hücresel immunité, T lenfosit, sitokinler

ABSTRACT

Objective: In the current study, it was aimed to investigate the roles of tissue cellular immunity and serum levels of cytokines in the patients with plaque psoriasis treated with calcipotriol-betamethasone dipropionate.

Materials and methods: The study included 20 patients with psoriasis. Peripheral blood and biopsy samples were collected from lesional and normal skins before and after treatment. The results were compared with each other.

Results: Immunohistochemical examination revealed significant elevations of CD4+, CD8+ and CD25+ T lymphocytes in the lesional tissues when compared to that in the healthy tissues and post treatment tissue ($p<0.001$, $p=0.013$ and $p<0.001$, respectively). These lymphocytes in the lesional tissues at post-treatment period were not higher than those in the healthy tissues ($p>0.05$). The levels of IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ and TGF- β 1 in serum were not significantly different between before and after treatment periods ($p>0.05$).

Conclusion: Our study demonstrated that there were infiltration of CD4+ and CD8+ cell in the lesional skin and CD8+ T-lymphocytes were the dominant cell types. The improvement of the lesions and significant decreases in CD4+ and CD8+ T-cells in accordance with the treatment strongly support the hypothesis that Th lymphocytes may have prominent roles in the immunopathogenesis of the disease. However, our findings showed that sufficient T-cells still remains in the tissue, which is consistent with the chronic characteristic of the disease, and the topical treatment could not be able to prevent the activation of the disease.

Key words: Psoriasis, pathogenesis, cell-mediated immunity, T-lymphocytes, cytokines

GİRİŞ

Psöriazis, üzerinde en çok çalışılan hastalıklardan biri olmasına karşın, etyopatogenezi henüz tam aydınlatılamamıştır. Etyopatogenezi suçlanan faktörler genetik, epidermal keratinosit bozuklukları, lökosit kemotaktik faktörleri, büyüme faktörleri ve bağlayıcı proteinleri, poliaminler, siklik nükleotidler, proteinazlar ve immünolojik mekanizma değişiklikleridir.¹ Hastalığı tetikleyen faktör ne olursa olsun, keratinosit hiperproliferasyonu, epidermis ve dermiste enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler değişiklikler meydana gelmekte; bu değişiklikler hem doğal hem de kazanılmış immün sistem aktivasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır.²⁻⁴

Psöriazisin immunopatogenezi ile ilgili olarak son yirmi yılda yapılan çalışmalar T lenfositlerin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin rolü üzerinde yoğunlaşmıştır.⁴⁻⁶

Bu çalışmada psöriazis vulgarisli olguların deri ve kan örneklerinde T lenfosit subgrupları ve sitokin düzeyleri ölçülerek hastalığın immunopatogenezindeki rolleri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Deri ve Zührevi Hastalıkları Polikliniğine başvuran son üç ay içinde sistemik ve son bir ayda topikal herhangi bir tedavi almamış, vücut yüzeyinin %20'sinden azında tutulum olan 20 psöriazis vulgarisli hasta alındı. Gebe veya emziren kadınlar, 18 yaşından küçükler, kontrole gelemeyecek olanlar ile psöriazisin seyrini etkileyebilecek başka hastalığı olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Çalışma için Yerel Etik Komiteden izin ve çalışmaya alınan hastalardan imzalı onay formu alındı. Çalışma öncesi ve sonrası hastaların klinik belirti ve bulguları değerlendirildi ve genel sağlık kontrolleri yapılarak çalışma formuna aynı araştırmacılar tarafından kaydedildi.

Hastalığın yaygınlığı ve şiddeti Psoriasis Area Severity Index- Psoriasis Alan Şiddet İndeksi (PASI) yöntemi kullanılarak belirlendi. Tedavi öncesinde hastaların hem lezyonlu hem de sağlam derilerinden biyopsi ve sitokin düzeyleri için 5 ml kan alındı. Hastalara lezyonlarına sabah % 0.025'lik betametason dipropionat ve akşam % 0.05'lik kalsipotriol pomad uygulamaları önerildi. Ayda bir kez kontrole çağrılan hastaların lezyonlarındaki PASI %75 ve üzeri gerileme, iyileşme olarak kabul edildi. Has-

ta- ların iyileşen lezyonlarından ikinci kez biyopsi ve eş zamanlı olarak 5 ml kan alındı.

İmmunohistokimyasal boyama için 5 mm parafin kesitleri, ksilol içerisinde önce deparafinize sonra rehidrate edildi ve daha sonra fosfat tampon solüsyon (PBS) banyosuna kondu (pH 7,6). Antijeni geri döndürme işlemi kaynayan sitrat tamponu (0.01 M) içerisinde 15 dakika tutularak yapıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3 hidrojen peroksit ile 5 dakika muamele edildi ve deiyonize su ile yıkanarak daha sonra PBS içerisinde konuldu. Kesitlerde spesifik olmayan boyanmayı azaltmak için önce %1'lik pre-immun tavşan serumu ile, daha sonra CD4, CD8 ve CD25'e karşı monoklonal antikorlar ile oda ısısında 1 saat süre ile inkübe edildi. İmmun tespiti 3-amino 9-ethyl carbazole chromogen (Dako, Carpinteria, CA) ile biyotin-streptavidin saptama sistemi (BioGenex, San Ramon, CA) kullanılarak yapıldı. Dokular, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve dehidrate edilip, permount ile lamel kapatıldı.

İmmunohistokimyasal olarak boyama patoloğ gözlemci (NA) tarafından semikantitatif olarak skorlandırıldı. İmmun boyanma şiddeti; 0 (boyanma hiç yok), 1 (hafif derece), 2 (orta derece) ve 3 (şiddetli derece) olarak değerlendirildi.

Sitokin Düzeyleri Ölçümü: Hastalardan alınan kan, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve -80 °C'de çalışılana kadar saklandı. Hastaların serumları, Triturus Diagnostic-Grifols, S.A. (Barcelona-Espana) cihazında, Human Biosource (TGF- β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-4) kitleri kullanılarak ELISA yöntemi ile sitokin düzeyleri çalışıldı ve sonuçlar pg/ml birimi ile ifade edildi.

İstatiksel değerlendirme

Bilgisayar ortamında SPSS 10.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler sayı, yüzde ve ortalama±standart hata olarak sunuldu. Dokuda lenfositlerin istatistiksel analizinde "Ki-kare testi" ve sitokin düzeylerini değerlendirmede "Wilcoxon testi" uygulandı. İstatiksel olarak p<0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların 10'u erkek, 10'u kadındı. Yaşları 18-58 arasında ve yaş ortalamaları 37±12 yıldı. Hastalık süreleri 1-20 yıl arasında değişmekteydi. Olguların tedavisi öncesi ortalama PASI sko-

ru 5.46 ± 1.41 iken, tedavi sonrası ortalama PASI skoru 1.09 ± 0.38 olup, PASI iyileşme oranı %80.2 olarak bulundu.

İmmunohistokimyasal incelemede, CD4+, CD8+ ve CD25+ T lenfositler, tedavi öncesi lezyonlu dokuda sağlam doku ve tedavi sonrası doku ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde yüksekti (sıra-

sıyla, $p < 0.001$, $p = 0.013$ ve $p < 0.001$). Tedavi sonrası lezyonlu dokudaki CD4+ ve CD8+ ve CD25+ T lenfositler ise sağlam dokudan farklı değildi ($p > 0.05$) (Tablo 1, 2 ve 3).

IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ ve TGF- β 1 değerlerinde tedavi sonrasındaki değişiklikler tedavi öncesine göre anlamlı değildi ($p > 0.05$) (Tablo 4).

Tablo 1. Doku CD4+ lenfosit yoğunluğu

| | Doku örneklerindeki lenfosit yoğunluğu | | | |
|-----------------------------|--|------------------|------------------|------------------|
| | Skor 0 (n=20) | Skor 1 (n=20) | Skor 2 (n=20) | Skor 3 (n=20) |
| Tedavi öncesi lezyonlu doku | 3/20 | 1 / 20 | 7/20 | 9 /20 |
| Sağlam doku | 12/20 | 6 /20 | 2/20 | 0 /20 |
| Tedavi sonrası doku | 6/20 | 9/20 | 2/20 | 3/20 |

$p_1 = 0.001$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku- sağlam doku), $p_2 = 0.329$ (Tedavi sonrası doku -sağlam doku), $p_3 = 0.005$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku-tedavi sonrası doku)

Tablo 2. Dokuda CD8+ lenfosit değerleri

| | Doku örneklerindeki lenfosit yoğunluğu | | | | P |
|-----------------------------|--|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | Skor 0 (n=20) | Skor 1 (n=20) | Skor 2 (n=20) | Skor 3 (n=20) | |
| Tedavi öncesi lezyonlu doku | 6/20 | 8/20 | 5/20 | 1/20 | $p_1 = 0.013$ |
| Sağlam doku | 16/20 | 3/20 | 1/20 | 0/20 | $p_2 = 0.560$ |
| Tedavi sonrası doku | 11/20 | 3/20 | 6 20/ | 0/ 20 | $p_2 = 0.560$ |

$p_1 = 0.013$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku- sağlam doku), $p_2 = 0.560$ (Tedavi sonrası doku -sağlam doku), $p_3 = 0.560$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku-tedavi sonrası doku)

Tablo 3. Dokuda CD25+ lenfosit yoğunluğu

| | Doku örneklerindeki lenfosit yoğunluğu | | | |
|-----------------------------|--|------------------|------------------|------------------|
| | Skor 0 (n=20) | Skor 1 (n=20) | Skor 2 (n=20) | Skor 3 (n=20) |
| Tedavi öncesi lezyonlu doku | 3/20 | 11/ 20 | 4/20 | 2/20 |
| Sağlam doku | 16/20 | 3/20 | 1/20 | 0/20 |
| Tedavi sonrası doku | 9/20 | 7/20 | 3/20 | 1/20 |

$p_1 = 0.001$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku- sağlam doku), $p_2 = 0.172$ (Tedavi sonrası doku -sağlam doku), $p_3 = 0.329$ (Tedavi öncesi lezyonlu doku-tedavi sonrası doku)

Tablo 4. Hastaların tedavi öncesi ve sonrası serum sitokin düzeyleri (Ortalama \pm standart hata)

| Sitokinler | Tedavi öncesi (n=20) | Tedavi sonrası (n=20) | P |
|------------------------|----------------------|-----------------------|-------|
| IL-4 (pg/ml) | 16.28 \pm 1.19 | 16.69 \pm 1.41 | 0.844 |
| IL-10 (pg/ml) | 22.33 \pm 0.69 | 22.66 \pm 0.70 | 0.748 |
| TNF- α (pg/ml) | 27.13 \pm 0.83 | 28.97 \pm 0.88 | 0.154 |
| IFN- γ (pg/ml) | 47.85 \pm 1.58 | 48.07 \pm 1.81 | 0.226 |
| TGF- β 1 (pg/ml) | 117.55 \pm 26.14 | 130.58 \pm 28.09 | 0.555 |

TARTIŞMA

Psoriasis etyopatogenezini aydınlatmak amacıyla yapılan birçok çalışma T hücreleri ve sitokinlerin psöriazis lezyonlarının gerek başlamasında, gerekse hastalığın sürdürülmesindeki rolü üzerinde yoğunlaşmıştır.^{5,6} Fransa'da yapılan bir çalışmada plak psöriyazisli hastaların lezyonlarında, dermis ve epidermiste CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin baskın olarak bulunduğu saptanmış ve keratinosit proliferasyonundan asıl sorumlu olan sitokinlerin CD4+ T lenfosit kaynaklı olduğu bildirilmiştir.⁷ Yine Zhu ve ark. yaptıkları çalışmada psöriazisin Th1 dominant immun yanıtına bağlı otoimmün bir hastalık olduğu ve lezyonlarda CD4+ lenfositlerin anlamlı düzeyde arttığını gözlemlemişlerdir.⁸ Cabrijan ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise CD4+ ve CD8+ lenfositlerin patogeneze temel rol oynadığı ve her iki lenfosit grubunun hastaların lezyonlu epidermis ve dermislerinde anlamlı düzeyde arttığını bildirmişlerdir.⁹

Langewouters ve ark. psöriazisli hastalarda topikal steroid ve adefasept kombinasyonunun dolaşan T-hücre alt tipleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada adefaseptin özellikle CD45RO+ lenfosit popülasyonunu ve diğer bazı subgrupları azalttığını göstermişlerdir.¹⁰ Çalışmamızda, immunohistokimyasal boyama ile lezyonlu derideki CD4+ T lenfosit yoğunluğu, hem tedavi sonrasında hem de sağlam deriye göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.001$). Bu bulgu, yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Tedavi ile CD4+ T lenfositlerde anlamlı bir azalma meydana gelmesi, Th lenfositlerin immunopatogeneze önemli rolünün olduğu tezini kuvvetle desteklemekte ve ayrıca topikal uygulanan betametason dipropionat ve kalsipotriol pomad tedavisinin T hücre sayısını azalttığını göstermektedir. CD8+ T lenfosit yoğunluğu tedavi öncesi lezyonlu deride, sağlam deriye göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p = 0.013$). Tedavi öncesi ve sonrası CD8+ lenfosit yoğunluğu kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık yoktu. Bu sonuç, lezyonlu dokularda CD8+ T lenfositler artmış olsa da CD4+ T lenfositlerin daha hâkim hücre grubu olduğunu görüşünü desteklemektedir.

T lenfositlerin immun efektör ve immun düzenleyici fonksiyon gösteren birden fazla alt tipi vardır. CD25, T lenfositlerdeki IL-2 reseptörüdür ve aktive olmuş T lenfositlerin bir markırıdır.¹¹ Birçok çalışmada psöriatik plaklardaki Th hücrelerin uyarılmış

durumda oldukları bildirilmektedir.^{4,5} Abul ve ark. yaptıkları çalışmada, hastalarda periferik T lenfosit alt tiplerinin sağlıklı kontrol grubuna göre artmış olduğunu ve psöriazisin aktive olmuş T lenfositlere bağlı bir hastalık olduğunu bildirmişlerdir.¹² Çalışmamızda, CD25+ T hücrelerinde tedaviye rağmen anlamlı bir azalma olmamıştır. Bunun sebebinin, hastalığın kronik tabiatı ile uyumlu olan T hücrelerin (hafıza veya diğer) dokuda yeterince kalabilmesi ve topikal tedavinin aktive T hücrelere tam immunosupresyon sağlamadığı ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz. Ayrıca, aktive olduğu düşünülen CD25+ T lenfositler içerisinde (Treg) T regülatör hücreler de yer almaktadır. Treg hücreleri ayırt edecek özel bir belirteç kullanılmadığından belki de tedavinin immunosupresyon yaparken aynı zamanda Treg hücrelerin de burada kalmasını sağlamış olabileceği var sayılabilir.

Psöriazis bir Th1 ilişkili hastalık olarak kabul edilmektedir. Friedrich ve ark. çalışmalarında psöriatik lezyonda IFN- γ ve TNF- α sitokinlerin fazla miktarda; IL-2 ve IL-4'ün ise düşük düzeyde ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, psöriazisteki epidermal T hücrelerin büyük kısmının tip 1 sitokin üreten hücreler olduğunu ve bu bölgedeki T hücrelerinin IFN- γ üretebildiğini göstermişlerdir.¹³ Roussaki-Schulze ve ark. periferik kanda IL-2, IL-10, IL-12 ve TNF- α seviyelerinin plak tip psöriazisli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ederken; IL-6 seviyesinin sağlıklı kişilerle farklı olmadığını, INF- γ seviyesinin ise sağlıklı bireylere göre düşük olduğunu göstermişlerdir.¹⁴ Çalışmamızda, serum IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ ve TGF- β 1 değerlerinde tedavi sonrasındaki değişiklikler tedavi öncesine göre anlamlı değildi. Bu sonuçlar, uygulanan tedavinin lokal olarak etkili olduğunu fakat periferik kandaki sitokin düzeylerine yansımalarının fazla olmadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız lezyonlu deride CD4+ ve CD8+ hücre birikimi olduğu ve CD4+ T lenfositlerin daha hâkim hücre grubu olduğunu göstermektedir. Uygulanan topikal tedavinin etkinliğine paralel olarak lezyonlarda düzelme olmasının ve lezyonlu bölgelerde CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde anlamlı bir azalma meydana gelmesinin, Th lenfositlerin hastalığın immunopatogeneze önemli rolü olduğu tezini kuvvetle desteklemektedir. Ancak, aktive T lenfosit (CD25+ T lenfosit) yoğunluğunda tedavi öncesi ve sonrası arasında anlamlı bir farklılık olmaması, hastalığın kronik özelliği ile

uyumlu T hücrelerin yine de dokuda yeterince kaldığını ve topikal tedavinin hastalığın aktivasyonunu engelleyemediğini göstermektedir. O halde ileride, yapılacak olan çalışmalarda tedavide topikal T lenfosit blokerlerinin kullanılmasının daha efektif sonuçlar verebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ortonne JP. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1996;135:1-5.
2. Ghoreschi K, Mrowietz U, Röcken M. A molecule solves psoriasis? Systemic therapies for psoriasis inducing interleukin 4 and Th2 responses. *J Mol Med* 81:471-480.
3. Griffiths CEM, Barker NWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007;307:263-271.
4. Krueger JG, Bowcock A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64 (Suppl 2):30-36.
5. Asadullah K, Docke WD, Volk HD, Sterry W. The pathophysiological role of cytokines in psoriasis. *Drugs Today* 1999;35:913-924.
6. Prinz JC. The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17: 257-270.
7. Bachelez H. Immunopathogenesis of psoriasis: Recent insights on the role of adaptive and innate immunity. *J Autoimmun* 2005; 25: 69-73.
8. Zhu K, Ye J, Wu M, Cheng H. Expression of Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors, T-bet and GATA-3, in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 2010; 302:517-523.
9. Cabrijan L, Lipozencic J, Batinac T, et al. The role of CD4 and CD8 lymphocytes and macrophages in psoriasis vulgaris. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009;17:162-165.
10. Langewouters AM, Bovenschen JN, De Jong EM. The effect of topical corticosteroids in combination with alefacept on circulating T cell subsets in psoriasis. *J Dermatol Treat* 2007;18: 279-285.
11. Graca L, Silva-Santos B, Coutinho A. The blind-spot of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 802-05.
12. Abul H, Mahmoud F, Al-Saleh Q, et al. Profiles of activated T lymphocytes in peripheral blood of Kuwaiti psoriasis vulgaris patients. *J Dermatol* 2002; 29:202-208.
13. Friedrich M, Krammig S, Henze M, et al. Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type 1 immunophenotype. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 519-521.
14. Roussaki-Schulze AV, Kouskoukis C, Petinaki E, et al. Evaluation of cytokine serum levels in patients with plaque-type psoriasis. *Int J Clin Pharmacol Res* 2005;25: 169-173.