

# Apoptoza w liszaju twardzinowym sromu u kobiet w okresie menopauzy

## *Apoptosis in lichen sclerosis of the vulva in menopausal women*

Helena Rotsztein<sup>1</sup>, Dorota Jesionek-Kupnicka<sup>2</sup>, Anna Zalewska<sup>3</sup>, Stanisław Łukaszek<sup>4</sup>

*Apoptoza, inaczej zaprogramowana śmierć komórki jest procesem, który w warunkach fizjologicznych, wraz z procesem proliferacji, bierze udział w tzw. obrocie komórkowym (cell turnover) i reguluje homeostazę w ustroju. W skórze proces rogowacenia nabłonka wielowarstwowego płaskiego jest formą zaprogramowanej śmierci komórek. Celem naszej pracy była ocena nasilenia zjawiska apoptozy w nabłonku wielowarstwowym płaskim w liszaju twardzinowym sromu w porównaniu z tkanką kontrolną nie objętą procesem chorobowym. W celu identyfikacji komórek apoptotycznych na skrawkach parafinowych zastosowano zmodyfikowaną metodę TUNEL przy użyciu zestawu ApoTag firmy Boehringer-Manheim (Niemcy). Wykazano, że we wczesnych zmianach w liszaju twardzinowym komórki apoptotyczne występowały średnio 5,4 na 100 komórek nabłonka, natomiast w zmianach starszych apoptoza była bliska 0. W grupie kontrolnej apoptoza wynosiła 1 na 100 komórek nabłonka. W limfocytach nacieków zapalnych apoptozy nie stwierdzono. Uzyskane wyniki wskazują na nasilenie procesu apoptozy w przebiegu liszaja twardzinowego sromu.*

**Słowa kluczowe:** liszaj twardzinowy, apoptoza, okres menopauzy

(Przeгляд Menopauzalny 2005; 3: 25–28)

Apoptoza, inaczej zaprogramowana śmierć komórki, jest uważana za proces fizjologiczny, uwarunkowany genetycznie [1, 2]. Prowadzi on do samounicestwienia komórki, która kurczy się, jądro ulega kondensacji, tworzą się uwypuklenia cytoplazmy, fragmenty komórki oddzielają się tworząc ciała apoptotyczne lub tzw. ciała Civatte'a (*dark cells*) [1, 3].

Proces apoptozy nie pociąga za sobą odczynu zapalnego, a komórki apoptotyczne ulegają fagocytozie. Identyfikacja komórek apoptotycznych w preparacie hi-

stopatologicznym może być trudna, ze względu na dynamikę zmian i szybki rozpad komórki (kilka godzin). W metodzie TUNEL, identyfikującej na skrawkach parafinowych komórki ulegające apoptozie, wykorzystane jest immunohistochemiczne znakowanie końców 3'OH oligonukleosomów, zdegradowanego w procesie rozpadu jądra komórki DNA w postaci barwnej reakcji.

Uważa się, że proces apoptozy może być elementem patomechanizmu wielu chorób – wirusowych, nowotworowych, zapalnych i autoimmunologicznych [4, 5]. Nie-

<sup>1</sup> Poradnia Dermatologiczna Przychodni Specjalistycznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Przychodni: dr med. Piotr Woźniak

<sup>2</sup> Zakład Patologii Nowotworów, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik: prof. dr hab. n. med. Radziśław Kordek

<sup>3</sup> Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Anna Sysa-Jędrzejowska

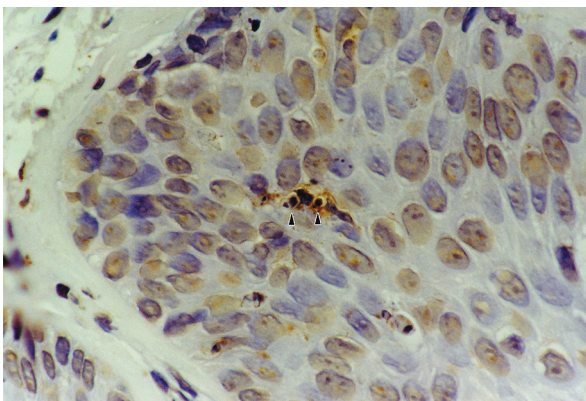
<sup>4</sup> Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig



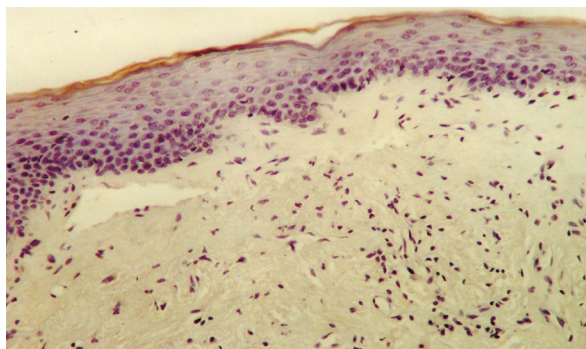
zbyt liczne są prace związane z oceną apoptozy w tkankach skóry zmienionej chorobowo [6–12]. Langley i wsp. wykazali apoptotyczne keratynocyty w biopsjach skóry, uzyskanych od chorych z GVHD [9]. Banno i wsp. obserwowali znacząco zwiększoną liczbę apoptotycznych neutrofilów w dojrzałych zmianach łuszczycowych [10]. Barduagni i wsp. wykryli różne układy komórek apoptotycznych zarówno w leukoklastycznym, jak i limfocytarnym zapaleniu naczyń, co jest najprawdopodobniej związane z dystrybucją nacieków zapalnych [12].

Liszaj twardzinowy sromu (*lichen sclerosus* – LS) jest wynikiem zaburzeń rogowacenia nabłonka i przewlekłego stanu zapalnego skóry właściwej o nie całkowicie wyjaśnionej etiologii. Aczkolwiek nie jest on uznany za stan przedrakowy, to jednak wiąże się z ryzykiem rozwoju dysplazji nabłonka sromu (VIN – *Vulvar Intraepithelial Neoplasia*) oraz raka płaskonabłonkowego [13, 14].

Mikroskopowe zmiany polegają na obecności znacznej hiperkeratozy, ścieńczeniu nabłonka, wygładzeniu brodawek skórnych, homogenizacji podścieliska skóry właściwej, z towarzyszącym przewlekłym



**Ryc. 1.** Wczesne zmiany – nieznaczny zanik nabłonka, rogowacenie, wąski pas warstwy homogennej, znaczne nacieki zapalne pod naskórkiem



**Ryc. 2.** Późne zmiany – znaczny zanik nabłonka, hiperkeratoza, szeroki pas warstwy homogennej, niewielkie nacieki zapalne

naciekiem zapalnym [15]. Ponieważ u podstaw rogowacenia nabłonka leży zjawisko apoptozy, wydaje się celowe zbadanie jej nasilenia w liszaju twardzinowym sromu, we wczesnej i późnej fazie choroby w porównaniu z tkanką kontrolną.

## Materiał i metodyka

Badaniem objęto 17 kobiet z LS sromu w wieku 52–75 lat oraz 5 kobiet po operacjach plastycznych krocza, przeprowadzonych z powodu nietrzymania moczu lub wypadania narządów rodnych, w wieku 50–69 lat. Biopsje pobierano ze zmian chorobowych, a w grupie kontrolnej ze skóry zdrowej i utrwalano w 10-% formalinie.

W badaniach zastosowano zestaw ApoTag firmy Boehringer-Manheim (Niemcy). Metoda ta polega na przyłączaniu do 3'OH oligofragmentów DNA, tworzących się w czasie apoptozy enzymu Tdt, znakowanych następnie immunohistochemicznie przeciwciałem anty-POD. Odparafinowane i uwodnione skrawki grubości 4 mikrometrów były trawione proteinazą K (sigma 120 mikrometrów/ml) przez 20 min w temperaturze pokojowej, następnie splukane wodą destylowaną i zanurzone w 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 10 minut dla zablokowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie po przepłukaniu w buforze fosforanowym o pH 7,4 (PBS), skrawki były inkubowane przez 10 min w temperaturze pokojowej. Kontrole odczynu wykonywano w ten sam sposób, lecz zastępując wodę destylowaną enzymem – terminalną transferazą deoksynukleotydylową (TdT).

## Wyniki

Na podstawie badań:

- I – wczesne zmiany [6] – nieznaczny zanik nabłonka, rogowacenie, wąski pas warstwy homogennej, znaczne nacieki zapalne pod naskórkiem.
- II – późne zmiany [11] – znaczny zanik nabłonka, hiperkeratoza, szeroki pas warstwy homogennej, niewielkie nacieki zapalne.

Do oceny komórek oprócz reakcji barwnej, zastosowano również kryteria morfologiczne apoptozy – obkurczenie cytoplazmy, kondensację lub fragmentację jądra komórkowego, niekiedy obecność ciałek apoptotycznych bez współistnienia reakcji zapalnej. Kryteria morfologiczne pozwoliły na wykluczenie komórek barwiących się niespecyficznie.

W zmianach wczesnych komórki apoptotyczne występowały śr. 5,4 na 100 komórek nabłonka (ryc. 1.), w zmianach starszych apoptoza była bliska 0 (ryc. 2.). W limfocytach nacieków zapalnych apoptozy nie stwierdzono. W grupie kontrolnej apoptoza wynosiła 1 na 100 komórek nabłonka (ryc. 3.).



## Omówienie

Apoptoza jest procesem, który w warunkach fizjologicznych reguluje homeostazę w ustroju. W skórze rogowacenie jest formą zaprogramowanej śmierci komórek [16].

W badanej grupie kontrolnej nabłonek sromu wykazywał minimalną apoptozę.

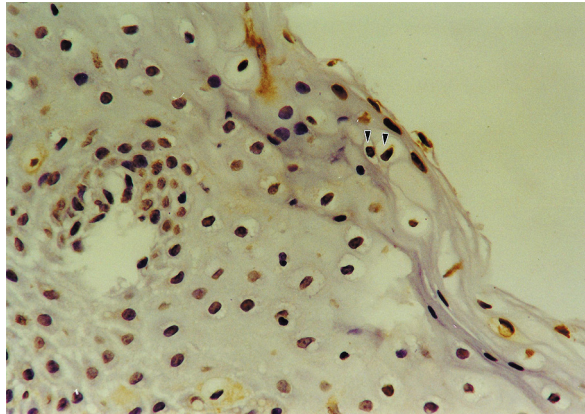
Dwa białka powierzchniowe mają istotny wpływ na przebieg procesu apoptozy. Częstka FAS/APO1 jest jednym z głównych czynników indukujących apoptozę, a częstka bcl2 ma wpływ na hamowanie tego procesu [1, 3, 17]. Sung i wsp. wykazali, że apoptoza indukowana przez Fas może odgrywać znaczącą rolę zarówno w chorobach skóry, jak i w warunkach fizjologicznych w zdrowym naskórku [17].

W przeprowadzonych badaniach wykazano zwiększoną apoptozę w keratynocytach, natomiast brak cech zaprogramowanej śmierci komórek w naciekach zapalnych LS. Powyższe zjawisko może prowadzić do przewlekania się procesu zapalnego i uszkodzenia tkanek, a w konsekwencji do nadmiernej produkcji cytokin.

Inni autorzy donoszą o zmniejszeniu apoptozy w komórkach jednojądrowych nacieków zapalnych skóry m.in. w SLE [18, 19]. Całkiem przeciwnie jest w raku kolczystokomórkowym, gdzie limfocyty nacieków zapalnych wykazują maszyną apoptozę, a komórki nowotworowe tylko cechy proliferacji [5, 8].

Brak eliminacji limfocytów T produkujących cytokiny zapalne i czynniki wzrostowe mogą przyczyniać się do zaburzeń apoptozy komórek nabłonkowych sromu. Proces ten może mieć wpływ na zaburzenie funkcji cząstek odpowiedzialnych za apoptozę – FAS/APO1 i bcl2 [7, 20, 21]. Bax, który jest białkiem X związanym z bcl2 uważany jest także za jeden z głównych czynników stymulujących procesy apoptozy. Tomkova i wsp. wykazali jego obecność w skórze zdrowej, zmianach łuszczykowych oraz zmniejszoną ekspresję w raku kolczystokomórkowym (SCC), natomiast jego brak w raku podstawnokomórkowym (BCC). Autorzy sugerują, że utrata proapoptotycznego białka bax w BCC i jego zmniejszona ekspresja w SCC mogą stanowić ważny krok w progresji tych dwóch nowotworów [8].

Badania ostatnich lat wskazują na rolę przeciwciał przeciw proteinie 1 (ECM1), stwierdzanych u chorych na LS. Białko to jest m.in. istotnym elementem mającym wpływ na różnicowanie keratynocytów. Zwiększona apoptoza w obrębie nabłonka LS może przyczyniać się do nasilonej fagocytozy. Fragmenty komórek uległych apoptozie mogą być w dalszym etapie rozpoznawane jako własne antygeny [22].



Ryc. 3. Grupa kontrolna

Gen supresorowy p53 jest najważniejszym strażnikiem reagującym na uszkodzenia DNA i dającym sygnał do wejścia komórki na drogę apoptozy [23]. Wzrost nadekspresji oraz mutacji genu p53 wykazano w nabłonku w LS i w dalszej sekwencji w raku płaskonabłonkowym sromu, co wyraźnie wskazuje na udział tego genu w patogenezie choroby [24]. Co więcej, wzrost ekspresji Ki67 (antygen proliferacji komórkowej) i p53 obserwowano po leczeniu miejscowym steroidami w wycinkach chorych na LS sromu. Jednocześnie nabłonek sromu w grupie kontrolnej nie wykazywał ekspresji wymienionych cząstek lub była ona niewielka. Fakt ten może być bezpośrednio związany ze zwiększoną apoptozą nabłonka zmienionego chorobowo w LS w badanej grupie chorych kobiet [25]. W naszych badaniach obserwowano wzmoczoną apoptozę komórek nabłonka w LS we wczesnych fazach choroby (indeks apoptotyczny 5,4%), podczas gdy w późnych fazach choroby indeks ten był równy zeru. Według badań, apoptoza jest najczęściej ograniczona do subpopulacji komórek dzielących się [26], co może wiązać się ze zmniejszeniem jej nasilenia po dokonaniu morfologicznych wykładników choroby, a więc hiperkratozy i ścięnięcia nabłonka. Niestety, badania apoptozy w LS są bardzo nieliczne i oprócz nieopublikowanych doniesień zjazdowych nie udało nam się znaleźć piśmiennictwa na temat indeksu apoptotycznego w liszaju twardzinowym sromu.

Badania autorów wskazują na to, iż apoptoza leży u podstaw patomechanizmu ścięnięcia nabłonka w LS sromu, natomiast zmniejszenie apoptozy w komórkach nacieku zapalnego może wiązać się z obecnością przewlekającego się zapalenia.

*Niniejsza praca została przedstawiona w części na zjeździe w Genewie w 2000 roku.*

*Niniejsza praca została sfinansowana z grantu UM w Łodzi nr 502-11-396.*





### Summary

*Apoptosis is a physiological process regulating homeostasis in the organism. Hyperkeratosis in the skin is regarded as a programmed cell death. The aim of the study was to evaluate apoptosis in lichen sclerosis of the vulva. ApoTag (Boehringer-Manheim, Germany) was employed in the study. It was demonstrated that in early lesions apoptotic cells accounted to 5,4 cell per 100 of epithelial cells, whereas in older lesions apoptosis was close to 0. Apoptosis was not observed in lymphocytic infiltrations. In the control group apoptosis was found in 1 per 100 epithelial cells. The obtained results indicate distorted apoptotic processes in lichen sclerosis.*

**Key words:** lichen sclerosis, apoptosis, menopause

### Piśmiennictwo

1. Haake AR, Polakowska RR. *Cell death by apoptosis in epidermal biology.* J Invest Dermatol 1993; 101: 107-12.
2. Wyllie A, Kerr JF, Currie AR. *Cell death: the significance of apoptosis.* Int Rev Cytol 1980; 68: 251-306.
3. Cohen JJ. *Apoptosis.* Immunology Today 1993; 14: 126-30.
4. Chang YT, Wong KC, Chow KC, Tsai CH. *Apoptosis in primary cutaneous amyloidosis.* Br J Dermatol 1999; 140: 210-5.
5. Kikuchi A, Nishikawa T. *Apoptosis and Proliferating Cells in Cutaneous Lymphoproliferative Diseases.* Arch Dermatol 1997; 133: 829-33.
6. Vermes I, Haanen C. *Apoptosis and programmed cell death in health and disease.* Adv Clin Chem 1994; 31: 177-81.
7. Teraki Y, Shiohara T. *Apoptosis and the skin.* Eur J Dermatol 1999; 9: 413-26.
8. Tomkova H, Fujimoto W, Arata J. *Expression of the bcl-2 homologue bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers.* Eur J Dermatol 1998; 8: 256-60.
9. Langley RG, Walsh N, Nevill T, et al. *Apoptosis is the mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host-disease.* J Am Acad Dermatol 1996; 35 (2Pt1): 187-90.
10. Banno S, Tamada Y, Matsumoto Y, et al. *Apoptotic cell death of neutrophils in development of skin lesions of patients with anaphylactoid purpura.* J Dermatol 1997; 24: 94-9.
11. Coven TR, Walters IB, Cardinale I, Krueger JG. *PUVA-induced lymphocyte apoptosis: mechanism of action in psoriasis.* Photodermatol Photoimmunol Photomed 1999; 15: 22-7.
12. Barduagni S, Frezzolini A, Ferranti G, et al. *In situ labeling of fragmented DNA in cutaneous necrotizing vasculitis.* J Dermatol Sci 1998; 17: 160-4.
13. Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, et al. *Vulvar lichen sclerosis and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia.* Hum Pathol 1998; 29: 932-48.
14. Vilmer C, Cavalier-Balloy B, Nagues C, et al. *Analysis of alterations adjacent to invasive vulvar carcinoma and their relationship with the associated carcinoma: a study of 67 cases.* Eur J Gynaecol Oncol 1998; 19: 25-31.
15. Carlson JA, Lamb P, Malfetano J, et al. *Clinicopathologic comparison of vulvar and extragenital lichen sclerosis: histologic variants, evolving lesions, and etiology of 141 cases.* Mod Pathol 1998; 11: 844-54.
16. Kulpa T. *Apoptoza – od teorii do praktyki.* Przegl Lek 1998; 55: 528-31.
17. Sung KJ, Paik EM, Jang KA, et al. *Apoptosis is induced by anti-Fas antibody alone in cultured human keratinocytes.* J Dermatol 1997; 24: 427-34.
18. Dimitrova Dlv, Michailova AP, Deliyska BP, et al. *Increased apoptosis in freshly isolated lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients.* Med sci monit 1999; 5 (6): 1049-54.
19. Jin Ho Chung, Oh Sang Kwon, Hee Chul Eun, et al. *Apoptosis in the Pathogenesis of Cutaneous Lupus Erythematosus.* Am J Dermatopathol 1998; 20 (3): 233-41.
20. Milner J. *The role of p53 in the normal control of cell proliferation.* Curr Opin Cell Biol 1991; 3: 282-6.
21. Polakowska RR, Haake AR. *Apoptosis: the skin from a new perspective.* Cell Death Differ 1994; 1: 19-32.
22. Oyama N, Chan I, Neill SM, et al. *Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis.* Lancet 2003; 362 (9378): 118-23.
23. King KL, Cidlowski JA. *Cell cycle and apoptosis common pathway to life and death.* J Cell Biochem 1995; 58: 175-80.
24. Rolfe KJ, Crow JC, Reid WM et al. *The effect of topical corticosteroids on Ki67 and p53 expression in vulval lichen sclerosis.* Br J Dermatol 2002; 147 (3): 503-8.
25. Rolfe KJ, Maclean AB, Crow JC, et al. *TP53 mutations in vulval lichen sclerosis adjacent to squamous cell carcinoma of the vulva.* Br J Cancer 2003; 89: 2249-53.
26. Evans DL, Tilby M, Dive C. *Differential sensitivity to the induction of apoptosis by cisplatin in proliferating and quiescent immature rat thymocytes in independent of the levels of drug accumulation and DNA adduct formation.* Cancer Res 1994; 54: 1596-603.

### Adres do korespondencji

dr n. med. **Helena Rotsztein**  
Poradnia Dermatologiczna  
Przychodni Specjalistycznej  
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi  
ul. Rzgowska 281/289  
93-338 Łódź

