

Hubungan antara ekspresi p53, indeks proliferasi sel, dan ketebalan epidermis pada psoriasis

Sekar Djatiningrum, Soedarmadi, Y. Widodo W.
Bagian Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS. Dr. Sardjito
Yogyakarta

ABSTRACT

Sekar Djatiningrum, Soedarmadi, Y. Widodo W – *The relationship between p53 expression, cell proliferation index and epidermal thickness in psoriasis*

Background: The specific process among psoriatic lesions is keratinocyte hyperproliferation state, and one of the genes that controls cell cycle is wild type of p53 gene. The correlation between p53 overexpression and psoriatic keratinocytes hyperproliferation has not been established yet.

Objective: To clarify the relationship between p53 overexpression and psoriatic keratinocyte proliferation index, as well as the epidermal thickness resulted from this proliferation.

Methods: 50 paraffin-embedded tissue sections were chosen from block collection of Pathologic Anatomy Department. The p53 overexpression was measured by counting the number of positive cell among 500 cell stained by antibody anti p53. The cell proliferation index was measured by counting the number of black dot among 100 epidermal cells stained by silver nitrate. The epidermal thickness, represented by the thickness of epidermal rete ridges was measured by using calibrated micrometer in hematoxylin stained section.

Results: p53 expression was significantly correlated in fairly degree with cell proliferation index ($r_s = + 0,47$; $P < 0,001$) and significantly correlated in moderately degree with epidermal thickness ($r_s = + 0,57$; $P < 0,001$). Cell proliferation index was significantly correlated in fairly degree with epidermal thickness ($r_s = + 0,37$; $P < 0,004$).

Key words: psoriasis – p53 – cell proliferation index – Ag NOR – epidermal thickness

ABSTRAK

Sekar Djatiningrum, Soedarmadi, Y. Widodo W – *Hubungan antar ekspresi p53, indeks proliferasi sel, dan ketebalan epidermis pada psoriasis*

Latar belakang: Proses spesifik pada lesi psoriasis adalah hiperproliferasi keratinosit, dan salah satu gena yang ikut mengatur siklus sel adalah gena p53 tipe *wild*. Korelasi antara overekspresi p53 dengan hiperproliferasi keratinosit psoriasis sampai saat ini belum jelas.

Tujuan: Untuk mengetahui hubungan antara overekspresi p53, indeks proliferasi keratinosit psoriatik, dan juga ketebalan epidermis akibat proliferasi.

Bahan dan cara: Limapuluh blok psoriasis diambil dari arsip yang tersimpan di Bagian Patologi Anatomi. Overekspresi p53 diukur dengan menghitung jumlah sel positif di antara 500 sel yang diwarnai dengan antibodi anti p53. Indeks proliferasi sel diukur dengan menghitung jumlah bintik hitam di antara 100 sel epidermis yang diwarnai dengan perak nitrat. Ketebalan epidermis dinilai dengan mengukur panjangnya *rete ridge* menggunakan mikrometer yang telah dikalibrasi.

Hasil: Ekspresi p53 berkorelasi secara bermakna dalam derajat cukup dengan indeks proliferasi sel ($r_s = + 0,47$; $P < 0,001$) dan berkorelasi secara bermakna dalam derajat sedang dengan ketebalan epidermis ($r_s = + 0,57$; $P < 0,001$). Indeks proliferasi sel juga berkorelasi secara bermakna dalam derajat cukup dengan ketebalan epidermis ($r_s = + 0,37$; $P < 0,004$).

Simpulan: Terdapat hubungan antara ekspresi p53 dengan indeks proliferasi sel, dan dengan ketebalan epidermis.

PENGANTAR

Psoriasis adalah kelainan kulit yang terjadi akibat hiperproliferasi keratinosit yang berhubungan dengan abnormalitas pengawasan diferensiasi keratinosit oleh berbagai gena yang terlibat dalam disregulasi sel¹. Dalam keadaan normal banyaknya keratinosit yang berproliferasi adalah 1.218 sel/mm²/hari, dan akan meningkat tajam hingga mencapai 35.000 sel/mm²/hari pada psoriasis^{2,3}.

Salah satu gena yang berperan mengontrol proliferasi sel adalah gena p53, yaitu gena yang menyandi fosfoprotein inti seberat 53 kD dan berperan memperpanjang G₁ *arrest* sehingga jika terjadi kerusakan DNA, kerusakan tersebut sempat dipulihkan sebelum sel memasuki fase sintesis. Mutasi pada gena tersebut menyebabkan protein mutan yang dihasilkan tidak mampu memperpanjang fase G₁ *arrest* sehingga siklus sel memendek dan proliferasi sel meningkat. p53 mutan tahan terhadap protease endogen sehingga memiliki waktu paruh panjang dan dapat dideteksi dengan teknik imunohistokimiawi. Pengukuran ekspresi p53 dapat dikerjakan dengan cara menghitung sel yang terwarnai oleh antibodi anti p53⁴.

Indeks proliferasi sel dapat diukur dengan menghitung bintik hitam *argyrophilic nucleolar organizer* (Ag NOR), yaitu bagian nukleus yang tercat hitam oleh perak nitrat. Dengan cara ini, jumlah bintik hitam AgNOR berkorelasi kuat dengan indeks proliferasi yang diukur melalui pelacakan radioisotop, pemberian label bromodeoxy-uridine (BrdU), sitometri-alur (*flow-cytometry*) maupun dengan pengecatan imunohistokimia, misalnya: Ki-67, *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) maupun MIB-1⁵. Hiperproliferasi keratinosit dapat berakibat penebalan epidermis seperti yang tampak pada ujud kelainan kulit (UKK) plak psoriasis. Hubungan ekspresi p53 dengan indeks proliferasi keratinosit psoriasis belum pernah dilaporkan.

Dalam makalah ini dilaporkan hubungan antara ekspresi p 53, indeks proliferasi keratinosit, dan ketebalan epidermis pada psoriasis.

BAHAN DAN CARA

Diambil 50 blok psoriasis yang tersimpan di Bagian Patologi Anatomi FK UGM. Dari setiap

blok parafin dibuat dua macam potongan, yaitu satu potongan dicat secara imunohistokimiawi dengan DAKO LSAB 2 kit, Peroxidase, antibodi monoklonal anti p53 manusia (DO-7), dan satu sediaan yang diwarnai dengan perak nitrat untuk menghitung indeks proliferasi sel. Pada sediaan juga dilakukan pengukuran ketebalan epidermis.

Ekspresi p53 dievaluasi dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 1.000 x, dihitung pada 500 sel epidermis secara acak. Penghitungan dilakukan pada sel yang positif yaitu berwarna merah dan sel yang negatif yaitu dengan inti berwarna biru.

Indeks proliferasi sel dinilai menurut metode yang dilaporkan oleh Crocker *et al.*⁶, yaitu dengan menghitung rerata jumlah bintik yang terwarnai perak (AgNOR) di antara 100 sel. Dengan menggunakan mikroskop cahaya, pembesaran 1.000x dalam minyak imersi, dievaluasi 100 sel epidermis pada setiap sediaan. Bintik hitam AgNOR dihitung secara hati-hati dengan mengubah fokus. Bila terdapat struktur polisiklik besar (NOR yang saling tumpang tindih) atau bintik-bintik hitam kecil yang menggerombol, maka dihitung sebagai AgNOR tunggal.

Dengan mikroskop cahaya pembesaran 100x dan 400x, ketebalan epidermis diukur pada rete ridge di 5 tempat yang paling tebal. Hasil pengukuran dikonversi dengan tebal yang ada. Penilaian dilakukan dengan menghitung rerata hasil pengukuran pada pembesaran 100x dan 400x.

Hubungan antara ekspresi p53, indeks proliferasi sel, dan ketebalan epidermis pada psoriasis dianalisis dengan korelasi *ranking* dari Spearman⁷.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 50 blok parafin penderita psoriasis, 33 (66%) berasal dari SMF Kulit dan Kelamin/IRNA I & IRJA RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dan 17 (34%) berasal dari luar. Data karakteristik penderita ekspresi p53, indeks proliferasi sel, dan ketebalan epidermis psoriasis tersaji pada TABEL 1.

Pada penelitian ini didapatkan 50 sediaan blok parafin biopsi kulit penderita psoriasis, terdiri dari 26 (52%) laki-laki dan 24 (48%) perempuan, atau perbandingan laki-laki : perempuan = 1.08 : 1. Hasil tersebut tidak berbeda dengan penelitian Farber &

TABEL1. – Karakteristik penderita, ekspresi p53, indek proliferasi sel, dan ketebalan epidermis psoriasis

Variabel (n = 50)	Frekuensi (%)		Rerata	Simpang Baku (SB)	Rentang	Min	Maks
	L	P					
Jenis kelamin	L	26 (52%)					
	P	24 (48%)					
Umur (tahun)			40,92	16,94	63,00	10,00	73,00
Ekspresi p53			256,94	121,04	438,00	52,00	490,00
Indeks proliferasi sel			1,60	0,32	1,59	1,11	2,70
Ketebalan epidermis (μm)			353,45	107,56	601,07	111,12	712,19

Nall (1998)⁸ yang melaporkan tidak adanya perbedaan rasio antara penderita psoriasis laki-laki dan perempuan, dan penelitian Cholis *et al.*⁹ yang melaporkan perbandingan laki-laki dan perempuan di 10 rumah sakit besar di Indonesia 1 : 1,09. Umur penderita pada penelitian ini berkisar antara 10 sampai 73 tahun, dengan rerata $40,92 \pm 16,94$ tahun, sedangkan Simon *et al.* (cit. Cholis *et al.*)⁹ melaporkan distribusi penderita psoriasis antara 3 sampai 78 tahun dengan rerata $37,55 \pm 16,68$ tahun.

Antibodi monoklonal anti p53 yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi yang bereaksi terhadap p53 mutan sekaligus p53 *wild*. Dengan demikian, ekspresi p53 yang dijumpai belum tentu merupakan p53 mutan. Menurut McNutt *et al.* (1994)⁴ pajanan sinar matahari dapat memperpanjang waktu paruh p53 *wild* sehingga dapat dideteksi pada epidermis. Pada penelitian ini semua sediaan diambil dari biopsi UKK psoriasis tetapi tidak tercatat regio tempat kulit diambil, sehingga tidak bisa dianalisis berdasarkan variabel ada tidaknya paparan matahari.

Dari 50 sediaan yang diwarnai dengan teknik ini terbukti semua sediaan memperlihatkan ekspresi p53, dengan rerata ekspresi p53 adalah $256,94 \pm 121,04$. Hasil ini berbeda dengan penelitian Moles *et al.* (1993)¹⁰ yang tidak menemukan ekspresi p53 positif pada pewarnaan imunohistokimiawi dengan antibodi p53 pada biopsi kulit psoriasis. Sebaliknya, Schmid *et al.* (1993)¹¹ menemukan bahwa p53 tampak jelas terekspresi pada semua epidermis yang diambil dari biopsi UKK dan kulit normal penderita psoriasis. Hannuksela-Svahn *et al.* (1999)¹² dengan menggunakan antibodi p53 melakukan penelitian pada biopsi UKK dan kulit normal penderita psoriasis sebelum dan setelah terapi PUVA. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekspresi p53 lebih tinggi pada UKK

dibanding dengan pada kulit normalnya. Setelah terapi PUVA terjadi peningkatan ekspresi p53 pada UKK dan pada kulit normalnya. Pada UKK yang telah sembuh terjadi penurunan ekspresi p53.

Pada penelitian ini rerata indeks proliferasi sel adalah $1,60 \pm 0,32$. Gul dan Zergeroglu (1998)¹³ melaporkan jumlah bintik hitam AgNOR pada UKK psoriasis sama dengan pada kulit normal penderita yang telah ditusuk dengan jarum 15 hari sebelumnya, sedangkan jumlah AgNOR kulit penderita psoriasis secara bermakna lebih banyak dibanding dengan orang kulit normal. Kuantitas AgNOR erat hubungannya dengan kecepatan proliferasi sel, yakni semakin tinggi kuantitas AgNOR, semakin singkat waktu penggandaan sel¹⁴, dan berkorelasi dengan kemungkinan lama hidup penderita leukemia limfoblastik akut anak¹⁵ dan leukemia mieloblastik akut dewasa¹⁶.

Pada TABEL2, tampak bahwa ekspresi p53 secara bermakna berkorelasi dalam derajat cukup (*fair degree*) dengan indeks proliferasi sel ($r_s = +0,47$; $P < 0,001$) dan berkorelasi secara bermakna dalam derajat sedang (*moderate*) dengan ketebalan epidermis ($r_s = +0,57$; $P < 0,001$), tetapi tidak berkorelasi secara bermakna dengan umur.

Pada penelitian ini ekspresi p53 berkorelasi secara bermakna pada derajat cukup dengan indeks proliferasi sel. Antibodi monoklonal DO-7 yang digunakan pada penelitian ini tidak dapat membedakan p53 mutan pada p53 *wild*. Tetapi karena sifat p53 *wild* yang memiliki terekspresi merupakan p53 mutan. Protein p53 mutan tidak saja mampu menghambat aktivitas p53 *wild* yang ada, tetapi juga terbukti tidak memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel, menyebabkan sintesis rRNA meningkat sehingga waktu penggandaan sel menjadi cepat, dan akhirnya mengakibatkan proliferasi sel yang berlebihan. Hasil penelitian ini juga sesuai

TABEL 2. – Analisis kolerasi antara ekspresi p53 denngan Indeks Proliferasi Sel, Ketebalan epidermis dan Umur.

Variabel	Ekspresi p53	
	Koefisien korelasi Spearman (r_s)	p
Indeks proliferasi sel	+0,47*	< 0,001
Ketebalan epidermis (μ m)	+0,57**	< 0,001
Umur (tahun)	-0,03***	0,42

* $r = \pm (0,25 - 0,50)$: fair degree correlation
 ** $r = \pm (0,50 - 0,75)$: moderate degree correlation
 *** $r = \pm (0 - 0,25)$: little or no relationship⁷

dengan beberapa penelitian pada berbagai neoplasia manusia antara lain pada: karsinoma sel transisional¹⁷, tumor epitel thymus¹⁸, karsinoma payudara¹⁹, karsinoma laring²⁰, dan karsinoma hati²¹.

Pada penelitian ini ekspresi p53 juga berkorelasi secara bermakna pada derajat sedang dengan ketebalan epidermis psoriasis. Respon terhadap stimulasi endogen dan eksogen pada keratinosit psoriatik berbeda dengan keratinosit normal dan respon tersebut dimodulasi oleh berbagai faktor penghambat dan pemicu²². Regulasi abnormal pada psoriasis diduga akibat adanya sitokin mitogenik seperti TGF alfa, IL-6, EGR-R, IL-8 dan IL-10²³ yang kesemuanya diproduksi secara berlebihan. Di samping itu, di dalam sel terdapat rangkaian transduksi yang disandi oleh protoonkogen seperti c-ras, c-raf, HER-2 dan produk gena penghambat pertumbuhan seperti protein p53 pengikat DNA, yang mungkin dapat menyebabkan berkembangnya fenotip psoriasis berupa reaksi hiperproliferatif²⁴. Tampaknya ketebalan epidermis diperankan oleh pemendekan siklus sel sehingga waktu penggandaan sel menjadi cepat, dengan akibat proliferasi sel keratinosit berlebihan, dan akhirnya terjadi penebalan epidermis.

Tabel 3. – Analisis korelasi antara indeks proliferasi sel dengan ketebalan epidermis, dan umur

Variabel	Indeks proliferasi sel	
	Koefisien korelasi Spearman (r_s)	p
Ketebalan epidermis (μ m)	+0,37	0,004
Umur (tahun)	-0,23	0,057

Pada TABEL3 terlihat bahwa indeks proliferasi sel berkorelasi secara bermakna dalam derajat cukup dengan ketebalan epidermis ($r_s = +0,37$; $p = 0,004$), tetapi tidak berkorelasi secara bermakna dengan umur.

Pada penelitian ini indeks proliferasi sel berkorelasi secara bermakna dalam derajat cukup dengan ketebalan epidermis. Keadaan ini dapat diterangkan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Derenzini *et al*¹⁴, yang menyimpulkan bahwa area nukleolus berbanding lurus dengan aktivitas transkripsional RNA *polymerase I* dan berbanding terbalik dengan waktu penggandaan sel. Ukuran nukleoli berhubungan erat dengan aktivitas sintesis rRNA. Peningkatan progresif sintesis rRNA dan membesarnya nukleoli disebabkan oleh peningkatan kebutuhan biogenesis ribosomal, karena sebuah sel yang sedang membelah harus menduplikasi komponen proteinnnya sebelum pembelahan. Waktu untuk sintesis protein yang diperlukan untuk pembelahan sel menjadi lebih singkat, sehingga waktu penggandaan sel menjadi lebih singkat. Pada psoriasis keadaan tersebut akan mengakibatkan hiperproliferasi keratinosit sehingga terjadi penebalan epidermis.

Pada penelitian ini tidak terbukti bahwa indeks proliferasi sel berkorelasi secara bermakna dengan umur, sehingga bertambahnya umur penderita psoriasis belum tentu akan diikuti dengan penurunan indeks proliferasi sel. Agaknya pola inilah yang membedakan dengan individu normal. Menurut Pedrazzini *et al*.²⁵ pada orang normal bertambahnya usia individu seiring dengan penurunan persentase bintik hitam AgNOR.

SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan antara: ekspresi p53 dengan indeks proliferasi sel, dan dengan ketebalan epidermis psoriasis. Terdapat juga hubungan antara indeks proliferasi sel dengan ketebalan epidermis psoriasis.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan untuk membandingkan ekspresi p53 mutan, maupun indeks proliferasi sel pada psoriasis baru yang belum diterapi dengan kulit normal penderita, dan kulit orang sehat, pada daerah terpapar dan tidak terpapar sinar matahari.

KEPUSTAKAAN

1. Guilhou JJ, Basset-Seguin N. Oncogenes In: Dubertret L. Psoriasis. Brescia: ISED, 1994: 42-4.
2. Reichert U. Keratinocytes. In: Dubertret L. Psoriasis. Brescia: ISED, 1994: 34-41.
3. Weinstein GD, Kaplan RS, McCullough JL. Cell proliferation kinetics. In: Roenigk HH, Maibach HI, editors. Psoriasis. New York: Marcel Decker, 1998: 247-61.
4. McNutt NS, Saenz-Santamaria C, Volkenandt M, Shea CR, Albino AP. Abnormalities of p53 protein expression in cutaneous disorders Arch Dermatol 1994; 130:225-32.
5. Sadi NV, Barrack ER. Determination of growth fraction in advanced prostate cancer. J Urol (Suppl): 1991.
6. Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardised approach. J. Pathol 1989; 158: 185-8.
7. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and clinical biostatistic. Connecticut: Appleton & Lange, 1994: 188-222.
8. Farber EM, Nall L. Epidemiology: Natural history and genetics. In: Roenigk HH, Maibach HL, editors, Psoriasis. New York: Marcel Dekker Inc, 1998: 108-57.
9. Cholís M, Hakim L, Taufik H, Rofik A, Basuki S. Insidens psoriasis pada beberapa rumah sakit di Indonesia. In: Kumpulan naskah ilmiah Kongres Nasional IX PERDOSKI; Juli 8-11 1999. Surabaya: Airlangga University Press, 1999: 69-75.
10. Moles JP, Theillet C, Basset SN, Guilhou JJ. Mutation of the tumor suppressor gene TP53 is not detected in psoriatic skin. J. Invest Dermatol 1993; 101:100-2.
11. Schmid P, Cox D, McMaster GK, Itin P. in situ hybridization analysis of cytokine, protooncogen and tumour suppressor gene expression in psoriasis. Arch Dermatol Res 1993; 285: 334-40.
12. Hannuksela-Svahn A, Paakko P, Autio P, Reunala T, Karnoven J, Vahakangas K. Expression of p53 protein before and after PUVA treatment in psoriasis. Acta Derm Venereol 1999; 79: 195-9.
13. Gul. U, Zergeroglu S. demonstration of Koebner phenomenon with AgNOR counting in psoriasis. Turkish J Dermatopathol (Suppl): 1998.
14. Derenzini M, Trere D, Pession A, Govoni M, Sirri V, Chieco P. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. J Pathol 2000; 19: 181-6.
15. Herminto W. Analisis kecepatan proliferasi sel yang diukur dengan menggunakan pewarnaan perak spesifik terhadap protein *argyrophilic nucleolar organizer* region pada leukemia limfoblastik akut anak [Tesis]. Yogyakarta. Univ. Gadjah Mada, 2000.
16. Pich A, Chiusa L, Audisio E, Marmont F. Nucleolar organizer region counts predict complete remission, remission duration, and survival in adult acute myelogenous leukemia patients J. Clin Oncol 1998; 16: 1512-8.
17. Akpolat I, Baris YS, Yilmaz AF, Bakirtas M, Saylik A, Karagoz F, et al. Cathepsin B, p53 expression and AgNORs in transitional cell carcinoma. Neopl 1998; 45: 365-8.
18. Oyama T, Osaki T, Mitsudomi T, Ogawa R, nakanishi R, Sugio K, et al. p53 Alteration, Proliferating cell nuclear antigen, and nucleolar organizer regions in thymic epithelial tumors. Int J Mol med 1998; 1: 823-6.
19. Bankfalvi A, Schmitz K, mock T, Kemper M, Cubick "C, Bocker W. Relationship between AgNOR proteins, Ki-67 antigen, p53 immunophenotype and differentiation markers in archival breast carcinomas. Anal Cell Pathol 1998; 17:312-42.
20. Mahovlic V, Audy-Jurkovic S, ovanin-Rakic A, Bilusic M, Veldic M, Babic D, et al. digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. Anal Quant Cytol Histol 1999; 21:47-53.
21. Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schutz A, Katalinic A, Kockerling F, et al. Mutation of p53 tumor suppressor gene, apoptosis and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. Dig dis Sci 2000; 45:317-24.
22. Gibson LE, kPerry HO. Populosquamous eruptions and exfoliative dermatitis. In: moschella SL, hurley JH, editors. Dermatology. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995; 607-51.
23. Michel G, Mirmohammadsadegh A, Olasz E., Jarzebska-Deussen B, Muschen A, kemeny L, et.al. Demonstration and functional analysis of IL-10 receptors in human epidermal cells: decreased expression in psoriatic skin, down-modulation by IL-8, and up-regulation by an antipsoriatic glucocorticosteroid in normal cultured keratinocytes. J. Immunol 1997; 159: 6291-7.
24. Michel G. Auer H, Kemeny L, Bocking A, Ruzicka T. Antioncogene p53 and mitogenic cytokine interleukin-8 aberrantly regulated by the antipsoriatic drug tacrolimus (FK506). Biochemical Pharmacol 1996; 51: 1315-20.
25. Pedrazzini E, mamaev N, Slavutsky I, Age related decrease of NOR activity in bone marrow metaphase chromosomes from healthy individuals. Mol Pathol 1998; 51: 39-41.