

Flowcytometrisch onderzoek van normale en pathologisch veranderde humane epidermis, in het bijzonder van psoriasis

Citation for published version (APA):

Crombag, N. H. C. M. N. (1983). *Flowcytometrisch onderzoek van normale en pathologisch veranderde humane epidermis, in het bijzonder van psoriasis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19830630nc>

Document status and date:

Published: 01/01/1983

DOI:

[10.26481/dis.19830630nc](https://doi.org/10.26481/dis.19830630nc)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

FLOWCYTOMETRISCH ONDERZOEK VAN NORMALE EN PATHOLOGISCH VERANDERDE HUMANE EPIDERMIS, IN HET BIJZONDER VAN PSORIASIS

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van de graad van
Doctor in de Geneeskunde aan de
Rijksuniversiteit Limburg te Maastricht
op gezag van de Rector Magnificus
Prof. Dr. H.C. Hemker,
volgens het besluit van het College van Dekanen
in het openbaar te verdedigen in
de Aula van de Universiteit op
Donderdag 30 juni 1983
des namiddags te 16.00 uur

door

Nicolaas Hubert Christine Marie Noel Crombag

geboren te Bunde

Promotor: Prof. Dr. W.J.B.M. van de Staak

Copromotor: Dr. F.W. Bauer

Referenten: Prof. Dr. H.A.M. Hulsmans, Maastricht
Prof. Dr. Dr. F.W.J. Gribnau, Nijmegen
Dr. M.J. Woerdeman, Amsterdam

Aan mijn ouders

De onderzoeken beschreven in dit proefschrift zijn uitgevoerd in de Universiteitskliniek voor Huidziekten te Nijmegen (Hoofd: Prof. Dr. J.W.H. Mali). Onderdelen van het onderzoek werden gepubliceerd in de internationale literatuur:

Crombag, N. & Bauer, F.: De klinische mogelijkheden van de flowcytometrie. Ned. T. Geneesk., 123, nr. 25:1091, 1979.

Bauer, F.W., Crombag, N.H.C.M.N. & De Grood, R.M.: Flowcytometry in Dermatology. Read before the workshop: Epidermal cellular kinetics. XV International Congress of Dermatology, Mexico, 1977.

Bauer, F.W., Crombag, N.H.C.M.N., De Grood, R.M. & De Jongh, G.J.: Flow cytometry as a tool for the study of cell kinetics in epidermis. Investigations on normal epidermis. Br. J. Derm., 102:629-639, 1980.

Bauer, F.W., Crombag, N.H.C.M.N., De Grood, R.M. & Boezeman, J.: Quantification of deviations of the epidermal DNA distributions in psoriasis and the effect of therapy. In: Flowcytometry 4:377-381, 1980.

Bauer, F.W., Crombag, N.H.C.M.N., Boezeman, J. & De Grood, R.M.: Flow cytometry as a tool for the study of cell kinetics in skin 2. Cell kinetic data in psoriasis. Br. J. Derm., 104:271-276, 1981.

Inleiding

Hoofdstuk 1: het ziektebeeld psoriasis

- 1.1. klinische manifestatie
- 1.2. aetiologie
- 1.3. histologie
- 1.4. epiloog
- 1.5. referenties

Hoofdstuk 2: literatuuroverzicht van diverse methoden ter bestudering van de celproliferatie van normale en psoriasis epidermis

- 2.1. inleiding
- 2.2. radioactief gemerkte aminozuren
- 2.3. kleurstoffen
- 2.4. histogeometrie
- 2.5.1. mitotische index
- 2.5.2. mitotische index na stathmokinetische stoffen
- 2.6. autoradiografie
 - 2.6.1. inleiding en methoden
 - 2.6.2. labelling index
 - 2.6.3. volgen van gemerkte cellen op hun weg door de diverse compartimenten van de epidermis
 - 2.6.4. fraction labelled mitosis curve
 - 2.6.5. dubbele labelling methode
 - 2.6.6. continue labelling methode
 - 2.6.7. tellen van granulae
- 2.7. scintillatie telling
- 2.8. cytofotometrie
 - 2.8.1. statische cytometrie
 - 2.8.2. flowcytometrie
- 2.9. samenvatting en discussie
- 2.10 referenties

Hoofdstuk 3: flowcytometrie: de methode van onderzoek

- 3.1. inleiding
- 3.2. flowcytometer
- 3.3. afname techniek
- 3.4. bewerking van het monster
- 3.5. analyse van de gegevens
 - 3.5.1. histogram
 - 3.5.2. mathematische analyse
 - 3.5.3. coincidentie
- 3.6. moeilijkheden bij de interpretatie
 - 3.6.1. klontjes
 - 3.6.2. celbeschadiging, onvolledige kleuring en asymmetrie
 - 3.6.3. correlatie met celcyclus- en turn-overtijd
- 3.7. referenties

Hoofdstuk 4: DNA distributie in normale humane epidermis

- 4.1. inleiding
- 4.2. materiaal en methode
- 4.3. resultaten
 - 4.3.1. normaal waarden
 - 4.3.2. invloed van het geslacht
 - 4.3.3. invloed van de leeftijd
 - 4.3.4. invloed van het seizoen
 - 4.3.5. invloed van de plaats op het lichaam
- 4.4. discussie
- 4.5. referenties

Hoofdstuk 5: DNA distributie in laesies en klinisch niet aangetaste epidermis van psoriasispatienten

- 5.1. inleiding
- 5.2. materiaal en methode
- 5.3. resultaten
 - 5.3.1. psoriasis vulgaris
 - 5.3.2. inter-individuele en intra-individuele variantie

- 5.3.3. intralaesionale variantie
- 5.3.4. onrustige psoriasis
- 5.3.5. psoriasis pustulosa
- 5.3.6. klinisch niet aangetaste epidermis bij psoriasis
- 5.4. discussie
- 5.5. referenties

Hoofdstuk 6: DNA distributie in enkele andere dermatosen

- 6.1. inleiding
- 6.2. materiaal en methode
- 6.3. resultaten
 - 6.3.1. neurodermitis
 - 6.3.2. lichen ruber planus
 - 6.3.3. morbus Darier
 - 6.3.4. normale epidermis versus niet aangetaste epidermis bij personen met neurodermitis, resp. lichen ruber planus, resp. m. Darier
 - 6.3.5. normale epidermis versus laesie van neurodermitis, lichen ruber planus en m. Darier
 - 6.3.6. psoriasis vulgaris versus neurodermitis, lichen ruber planus en m. Darier
- 6.4. discussie
- 6.5. referenties

Hoofdstuk 7: flowcytometrische bepaling van de therapie-effecten van een aantal veel toegepaste therapie regimes bij psoriasis vulgaris

- 7.1. inleiding
- 7.2. dithranol
 - 7.2.1. inleiding
 - 7.2.2. materiaal en methode
 - 7.2.3. resultaten
 - 7.2.4. discussie

- 7.3. fotochemotherapie
 - 7.3.1. inleiding
 - 7.3.2. Goeckerman therapie
 - 7.3.2.1. inleiding
 - 7.3.2.2. materiaal en methode
 - 7.3.2.3. resultaten
 - 7.3.2.4. discussie
 - 7.3.3. PUVA therapie
 - 7.3.3.1. inleiding
 - 7.3.3.2. materiaal en methode
 - 7.3.3.3. resultaten
 - 7.3.3.4. discussie
- 7.4. Röntgen therapie
 - 7.4.1. inleiding
 - 7.4.2. materiaal en methode
 - 7.4.3. resultaten
 - 7.4.4. discussie
- 7.5. referenties

Samenvatting

Summary

Nawoord

Curriculum vitae.

INLEIDING.

Psoriasis is een genetisch bepaalde huidaandoening, die zich manifesteert als scherp begrensde, niet jeukende, rode, schilferende plekken. De oorzaak is onbekend. De beschikbare therapie is grotendeels empirisch en bestaat uit diverse combinaties van locale en orale chemotherapeutica.

Psoriasis wordt gekenmerkt door een versnelde celproliferatie. Celkinetische methoden bieden daarom de mogelijkheid psoriasis te onderzoeken. De ter beschikking staande technieken voor het verkrijgen van informatie over het proliferatiepatroon van normale en pathologisch veranderde epidermiscellen zijn arbeidsintensief en hebben vaak een beperkte statistische betrouwbaarheid. Het tijdsinterval tussen afname van het monster en het ter beschikking staan van de resultaten is aanzienlijk (hoofdstuk 2).

Flowcytometrie (hoofdstuk 3), een in de afgelopen jaren ontwikkelde methode, die snelle en kwantitatieve informatie over het proliferatiepatroon van een celpopulatie mogelijk maakt, wordt pas sinds kort in de dermatologie toegepast.

In dit proefschrift worden de bevindingen met de flowcytometer bij de proliferatie van normale en diverse vormen van pathologisch veranderde epidermis vermeld. In hoofdstuk 4 wordt aan de hand van de gevonden DNA verdelingen de turnover- en celcyclustijd van de normale humane epidermis bepaald. In hoofdstuk 5 worden de patronen van de epidermale celproliferatie bij diverse vormen van psoriasis, alsmede bij de klinisch niet aangetaste huid vermeld. Teneinde na te gaan of deze proliferatiepatronen specifiek voor psoriasis zijn, zijn in hoofdstuk 6 DNA verdelingen in de epidermale cellen bij een aantal andere dermatosen bepaald. De mogelijkheden van de flowcytometrie voor het onderzoek naar de celkinetische effecten van een aantal veel toegepaste therapeutische regimes bij psoriasis worden in hoofdstuk 7 vermeld, waarbij het therapeutisch effect van dithranol, van een aantal fotochemotherapeutische regimes en van röntgenbestraling is nagegaan.

De hier vermelde resultaten moeten worden gezien als een eerste bijdrage tot het uiteindelijke doel van deze studie: het onderzoek naar een snelle bepaling van de voor iedere individuele psoriasis patient optimale geneesmiddel- en behandelingsschemata in de hoop aldus een bijdrage te leveren tot verbetering van de therapieresultaten bij de behandeling van psoriasis.

HET ZIEKTEBEELD PSORIASIS.

- 1.1 Klinische manifestatie
- 1.2. Aetiologie
- 1.3 Histologie
- 1.4 Epiloog
- 1.5. Referenties

HET ZIEKTEBEELD PSORIASIS.

1.1. KLINISCHE MANIFESTATIE.

De typische psoriasislaesies bestaan uit erythemateuze plekken die bedekt zijn met een dikke, mica-achtige, zilvergrijze, niet adherente schilfering. De laesies zijn licht verheven boven de omringende normale huid. Na grattage van een laesie ontstaat het z.g. kaarsvetfenomeen, bij verder krabben ontstaan puntvormige bloedinkjes (teken van Auspitz). De scherp begrensde plekken kunnen in grootte variëren van enkele tot honderden cm². De aandoening jeukt als regel niet. Het verloop is voor de individuele patient onvoorspelbaar. Voor de meeste patienten is psoriasis een chronische, indolente aandoening met onbegrepen perioden van exacerbatie en van partiële remissie.

Ofschoon psoriasis op elke plaats op het lichaam kan voorkomen bestaan er toch een aantal predilectieplaatsen: behaarde hoofd, gehoorgangen, ellebogen, knieën en de sacraalstreek. Wanneer de lichaamplooien zijn aangetast spreekt men van psoriasis typus inversus.

De haargroei wordt in het algemeen nauwelijks aangetast, ondanks de vaak dikke schilferkorst op het behaarde hoofd (Comaish, 1969). Toch zouden haaruitval en kaalheid voorkomen zowel pleksgewijs als meer diffuus. Haarschacht anomalieën zijn bij psoriasis meermalen beschreven (Orfanos et al., 1970; Wyatt et al., 1972).

Nagelafwijkingen zijn frequent bij psoriasis. Bij aantasting van het proximale gedeelte van de nagelmatrix ontstaan putjes en deukjes; wanneer de aandoening zich in het nagelbed en hyponychium bevindt ontstaan onycholysis, subunguale keratose en olievlekken (Alkiewics, 1948; Lewin et al., 1972). Sinds de eerste publicatie van psoriasislaesies op de slijmvliezen door Oppenheim (1903) is het voorkomen van slijmvlieslaesies controversieel gebleven (Ingram, 1954; El-Zawahry, 1973; Buchner et al., 1976).

Psoriasisarthritis komt voor bij ongeveer 5% van de patienten met huidverschijnselen. Deze sero-negatieve arthropathie kan zich op meerdere manieren uiten (Moll, 1979). Door meerdere auteurs is een significant hogere coincidentie beschreven van psoriasis en diabetes mellitus (Binazzi et al., 1975), myopathie (Mom et al., 1975), colitis ulcerosa (Burch & Rowell, 1965), leverafwijkingen (Novotny, 1981) en enkele andere afwijkingen (Ganor, 1977).

Naast de meest voorkomende vorm, de bovenbeschreven psoriasis vulgaris, bestaan er een aantal varianten van psoriasis,

m.n. onrustige psoriasis, psoriasis pustulosa, acropustulosis en impetigo herpetiformis.

Bij de onrustige psoriasis manifesteren de zich ontwikkelende laesies zich als een zich snel uitbreidend erytheem met schilfering dat soms in zeer oppervlakkige pustels overgaat. Het begin is vaak meer acuut. De laesies geven soms een branderig gevoel. Ook een chronisch verlopende psoriasis vulgaris kan overgaan in de onrustige vorm met uitbreiding van bestaande en een massale eruptie van nieuwe laesies. In de onrustige fase kunnen de laesies via het Koebner mechanisme (Koebner, 1877) of via aggravatatie door irriterende stoffen zich vergroten zodat een erythrodermie ontstaat.

Psoriasis pustulosa kan zich ontwikkelen als complicatie van een langerbestaande psoriasis, vaak na voorafgaande therapie met corticosteroiden, of volgend op een onrustige fase. Psoriasis pustulosa kan ook beginnen als een atypische presentatie van een late psoriasis. In dit geval zijn meestal de handen en voeten aangedaan. De aandoening begint als een acute ziekte met koorts en ernstige algemene malaise. Er ontstaan grote gebieden waar de huid pijnlijk en ontstoken is met vele pusteltjes die kunnen samenvloeien tot geelgroene pusmeertjes. Bij een minder acuut begin kunnen gelocaliseerde of wijdverspreide anulaire erytheemplekken met pustels in de periferie ontstaan, die zich snel over grote gebieden van het lichaam kunnen uitbreiden. De pustels zijn steriel.

Bij de acropustulosis bestaan in de handpalmen en op de voetzolen scherp begrensde pustuleuze erupties. De pustels zijn steriel, de eruptie is hardnekkig en resistent tegen therapie. De laesies komen frequent voor bij personen die de typische psoriasislaesies elders hebben, of deze later ontwikkelen, en kunnen worden beschouwd als een variant van psoriasis.

Impetigo herpetiformis is een zeldzame pustuleuze eruptie, die klinisch en histologisch lijkt op een gegeneraliseerde psoriasis pustulosa. De aandoening kan zich ontwikkelen tijdens de laatste maanden van de zwangerschap. Gebieden, bestaande uit een pijnlijk erytheem met vele steriele pustels in de randen breiden zich vanuit de flexuren uit over het lichaam. De algemene toestand is ernstig gestoord met koorts, braken, diarree en hypocalcaemie, leidend tot delirium, convulsies en tetanie. Zonder behandeling is de mortaliteit hoog.

1.2. AETIOLOGIE.

Psoriasis is een van de meest voorkomende huidaandoeningen bij mensen met een blanke huid. De morbiditeit bedraagt 1-3% (Farber & Peterson, 1969; Hellgren, 1964, 1967; Braun-Falco, 1976). In tropen en sub-tropen zou psoriasis wezenlijk zeldzamer zijn dan in Noord-Europa (Baker, 1975; Eckes et al., 1975).

De psoriasis dispositie is met zekerheid genetisch bepaald

(Niermann,1964; Farber et al.,1974; Hoedemakers,1975; Braun-Falco,1976). Een bepaalde overervingswijze is evenwel niet met zekerheid vastgesteld. Niet vererfd daarentegen is de leeftijd waarop psoriasis zich voor het eerst manifesteert. Psoriasis kan zich vanaf de babyleeftijd (Lerner & Lerner, 1972) tot op hoge leeftijd voor het eerst manifesteren. Frequent treedt zij voor het eerst op in de tweede (Hellgren, 1967) en vijfde (Beckmann et al.,1977) levensdecade.

Behalve bovengenoemde genetische studies pleit tevens voor een genetische determinantie van psoriasis het significant hoger voorkomen van de histocompatibiliteitsantigenen HLA-A1, A2, A3, B13, Bw16, Bw17, B37, Bw39, Cw6, DRw6, en DR7 bij psoriasispatienten en hun familieleden (Russel et al., 1972; Svejgaard et al.,1974; Karvonen et al.,1975; Krulig et al.,1975; Woodrow et al.,1975; Guilhou et al.,1976; Farber & Cox,1981). Een verhoogde coincidentie van HLA-B27 en Bw38 en psoriasis arthropathica is tevens waargenomen (Marcusson et al.,1975; Buchanan et al.,1977). Volgens de onderzoeken van Beckman et al. (1977) zijn de antigenen HLA-B7 en B8 significant verlaagd bij personen met psoriasis.

Milieufactoren beïnvloeden de klinische expressie. Kennelijk is er sprake van een multifactorieel lijden (Lombolt, 1963; Watson et al.,1972; Krueger,1981). Van de factoren waarvan bekend is dat ze psoriasis precipiteren, is trauma de meest voorkomende. De eerste laesies verschijnen vaak ter plaatse van operatie- of vaccinatielettekens. Maltraiteren van de huid kan uitbreiding van oude of ontstaan van nieuwe laesies tot gevolg hebben. Een dergelijke Koebner-fenomeen kan ook ontstaan na zonneverbranding of andere vormen van dermatitis. In het bijzonder bij kinderen wordt een acute psoriasis van het guttata type voorafgegaan door perioden met tonsillitis of respiratoire infecties. Psoriasis kan worden verergerd door geneesmiddelen, in het bijzonder chloroquine. Systemische toediening van corticosteroiden leidt bij stoppen vaak tot een rebound effect. Een aantal patienten menen dat er verband bestaat tussen exacerbaties van hun psoriasis en perioden van emotionele onrust.

Ondanks de zeer vele studies die de laatste jaren aan een mogelijke pathogenese van psoriasis zijn gewijd (Farber & Cox,1981; Krueger,1981) en vele theorieën over mogelijke ontstaanswijzen van deze aandoening blijft de pathogenese van psoriasis toch nog onbekend.

1.3. HISTOLOGIE.

In dermatologische handboeken worden de histologische veranderingen in de epidermis van een volontwikkelde psoriasislaesie als karakteristiek beschouwd. Deze veranderingen bestaan volgens Lever & Schaumburg-Lever (1975) uit:

- 1) Verdikking van de epidermis (acanthose) met verlenging van de rete-lijsten, welke een gevolg is van uitgroei naar buiten en verlenging van de dermale papillen (Van Scott & Ekel, 1963).
- 2) Verlenging van de dermale papillen. De epidermis boven deze papillen is dunner dan normaal.
- 3) Het ontbreken van het stratum granulosum.
- 4) Parakeratotische hyperkeratose.
- 5) Micro-abscessen van Munro.

In werkelijkheid is de histologie vaak wisselend en niet specifiek voor psoriasis.

Het ontbreken van het stratum granulosum en de aanwezigheid van de parakeratose zijn niet obligatoir voor de gehele psoriasislaesie. Plaatselijk treden parakeratotische haarden op in het overwegend hyperkeratotische stratum corneum (Cox & Watson, 1972). In de acanthotische epidermis is de plaats van de proliferatieve celpopulatie niet beperkt tot de basale laag, maar verschijnen ook frequent mitosefiguren in de suprabasale cellagen (Van Scott & Ekel, 1963; Fry & Mc Minn, 1970; Penneys et al., 1970). Door verlenging van de rete-lijsten is de basaalmembraan en derhalve ook het oppervlak van de basale laag t.o.v. het epidermisoppervlak vergroot. Uit deze twee gegevens ontstaat een vergroting van het gebied van de proliferatieve epidermis met een factor 4-6 (Van Scott & Ekel, 1963; Rowe, 1966; Christophers & Braun-Falco, 1970).

De basale cellen en hun kernen zijn bij psoriasis groter dan in de normale epidermis. Deze toename in grootte is bij de cellen in het stratum spinosum nog meer uitgesproken (Halprin, 1972). Het cytoplasma is sterker in grootte toegenomen dan de kern (Marhle, 1975).

De veranderingen in de epidermiscellen worden door sommige auteurs beschouwd als een gevolg van exsudatie en immigratie van leukocyten, leidend tot parakeratose en Munro-abscessen (Pinkus, 1965; Suurmond, 1965; Pinkus & Mehregan, 1966).

Pinkus (1965) lanceerde het concept dat het afwisselend voorkomen van orthokeratose en parakeratose wordt veroorzaakt door rythmische suprapapillaire exsudatie. Een alternatief pathomechanisme wordt door Neumann (1978) voorgesteld. Deze auteur vindt beschadigde keratinocyten boven de toppen van die dermale papillen waarin de capillairen extreem zijn aangetast. Deze capillairverandering leidt tot stasis en daling van de zuurstofspanning. Onvoldoende energievoorziening

resulteert in een lytisch proces in de keratinocyten. In beginnende laesies bevinden de beschadigde epidermiscellen zich voornamelijk rond de adnexen en in de bovenste lagen van de epidermis. De rijke bloedvoorziening van het gebied rond de adnexen werkt volgens deze auteur als een sluis voor het transport van histiotoxische stoffen die leiden tot celbeschadiging. De hypoxie en de histiotoxische factoren zouden een focale beschadiging van de epidermiscellen tot gevolg hebben. Deze regressieve epidermale veranderingen leiden tot een reactieve regeneratie van de aanliggende rete-lijsten. De migratie van leukocyten wordt door Rupec (1970) en Neumann (1974) beschouwd als een necrotactische reactie op epidermale cytotoxiciteit.

In de dermale papillen van een psoriasis epidermis is een oedeem waarneembaar. Het dermale infiltraat is matig en bestaat uit neutrofiele granulocyten en mononucleaire cellen (Pinkus & Mehregan, 1966). Ook lymphocyten komen in groten getale voor (Braun-Falco & Schmoeckel, 1977).

In het centrum van de laesie is het infiltraat het meest uitgesproken (Soltani et al., 1972), terwijl zich in het overgangsgebied naar de normale epidermis een veel geringer infiltraat bevindt, dat overwegend uit macrofagen en mestcellen bestaat (Braun-Falco & Burg, 1970).

Uit de dermale papillen migreren serumeiwitten en leukocyten naar de epidermis. Deze zich op omschreven plaatsen verzamelde polymorf-kernige neutrofiele leukocyten geven aanleiding tot de vorming van Munro-abcessen in het stratum corneum. Los hiervan bevinden zich in de verbrede epidermis altijd intercellulair enkele macrofagen, neutrofiele leukocyten en mestcellen.

In de papillen van actieve psoriasislaesies zijn de capillairen sterk verlengd en verwijd (Illig, 1966). De capillaire veranderingen nemen van de rand naar het centrum van de laesie toe (Wohlrab, 1963; Beek & Van Reede, 1977). De endotheelcellen van deze capillairen geven een sterke stijging van de glycolytische en hydrolytische enzymactiviteit te zien (Herrman et al., 1962; Braun-Falco & Burg, 1970). De capillaire doorlaatbaarheid is verhoogd (Baker, 1975). Deze capillairveranderingen gaan tijdens de therapeutisch geïnduceerde genezing van de laesie slechts zeer langzaam terug (Braun-Falco et al., 1971). Of de capillairveranderingen voortgaan aan de psoriasislaesie (Madden, 1941) of hiervan een gevolg zijn als aanpassing aan de toegenomen stofwisselingsbehoefte (Braun-Falco, 1976) is tot op heden niet opgelost (Greither, 1977). Ook de vraag of het ontstekingsinfiltraat in de dermis oorzaak of gevolg van de epidermale veranderingen is, is nog niet met zekerheid beantwoord.

Bij elektronenmicroscopisch onderzoek blijkt de meest wezenlijke verandering in de psoriasisellen de cytotoxiciteit van de keratinocyten van het stratum spinosum te zijn. Deze cytotoxiciteit begint perinucleair. De penetratie van leukocyten is secundair (Rupec, 1970). In de basale keratinocyten is het

aantal mitochondria sterk verhoogd. Tonofilamenten en desmosomen zijn schaars in het onderste deel van de epidermis, terwijl deze in het bovenste deel van het stratum spinosum sterk zijn toegenomen. Zij hebben dan echter wel een abnormale vorm (Fischman et al., 1977). De intercellulaire ruimte is verbreed. Deze verbreding berust op intercellulair oedeem en vermindering van intercellulaire contactzone (Weinstein & McNutt, 1972; Rupec, 1970; Mahrle, 1975). De op het celmembraan van de keratinocyten aanwezige microvilli zijn bij psoriasis sterk verlengd (Gommans et al., 1979). De hoeveelheid materiaal van de basale lamina is voornamelijk in oude laesies toegenomen, terwijl in actieve laesies een groot aantal openingen in de basale lamina zijn waardoor epidermaal cytoplasma in de dermis uitpuilt (Brody, 1962; Cox, 1969). In het karyoplasma van capillaire endotheelcellen, fibroblasten en in geringere mate van macrofagen en keratinocyten is een verhoogd aantal insluitlichaampjes die glycogeen en lipiden bevatten, gevonden. Deze insluitlichaampjes zijn niet specifiek voor psoriasis (Bork et al., 1975).

1.4. EPILOOG.

Het hierboven beschrevene aangaande het ziektebeeld psoriasis pretendeert geenszins volledig te zijn. Psoriasis mag zich verheugen in een zeer grote belangstelling van onderzoekers van uiteenlopende disciplines. Het zou te ver voeren hier in het kader van dit proefschrift te streven naar een volledig overzicht, indien dit al mogelijk zou zijn daar gedurende de laatste 10 jaar meer dan 3200 artikelen met "psoriasis" in hun titel zijn vermeld in de Index Medicus. Er is getracht slechts een beperkt en beknopt overzicht van dit ziektebeeld te geven teneinde de niet met psoriasis bekend zijnde lezer enig inzicht in deze aandoening te verschaffen.

Ondanks het soms zeer klassieke klinische beeld van psoriasis komt het bepaald niet zelden voor dat de diagnose op grond van de klinische efflorescenties slechts met moeite gesteld kan worden. Deze problemen bij het stellen van de diagnose en de tevens bestaande onzekerheid op histologisch gebied maken het wenselijk dat een nieuwe parameter in de vorm van flowcytometrie voor de diagnostiek van psoriasis beschikbaar komt.

1.5. REFERENTIES.

- Alkiewicz, J.: Psoriasis of the nail. *Br. J. Derm.*, 60:195-200, 1948.
- Baker, H.: Psoriasis: A review. Part I-II. *Dermatologica*, 150:16-25, 136-153, 1975.
- Beckman, L., Bergdahl, K., Cedergren, B. & Liden, S.: Genetic markers in psoriasis. *Acta Dermatovener.*, 57:247-251, 1977.
- Beek, C.H. & van Reede, E.C.: The nature and frequency of the histological changes found in psoriasis vulgaris. *Arch. Derm. Res.*, 257:255-264, 1977.
- Binazzi, M., Calandia, P. & Lisi, P.: Statistical association between psoriasis and diabetes. *Arch. Derm. Res.*, 254: 43-49, 1975.
- Bork, K., Holzmann, H. & Bierther, M.: Zur Ultrastruktur der Kerneinschlüsse von Bindegewebszellen in Psoriasis herd. *Arch. Derm. Res.*, 253:85-90, 1975.
- Braun-Falco, O.: Neuere Aspekte zur Pathogenese der Hauterscheinungen bei Psoriasis vulgaris. *Hautarzt*, 27:363-374, 1976.
- Braun-Falco, O. & Burg, G.: Das entzündliche Infiltrat bei Psoriasis vulgaris. *Arch. klin. exp. Derm.*, 236:297-314, 1970.
- Braun-Falco, O. & Burg, G.: Zur Histochemie der Capillaren bei Psoriasis vulgaris. *Arch. klin. exp. Derm.*, 236:173-189, 1970.
- Braun-Falco, O., Burg, G. & Schoefinius, H.H.: Ueber die Wirkung von Dithranol (Cignolin[®]) bei Psoriasis vulgaris. *Arch. Derm. Forsch.*, 241:217-236, 1971.
- Braun-Falco, O. & Schoeckel, C.: The dermal inflammatory reaction in initial psoriatic lesions. *Arch. Derm. Res.*, 258:9-16, 1977.
- Brody, I.: The ultrastructure of the horny layer in normal and psoriatic epidermis as revealed by electron microscopy. *J. Invest. Derm.*, 39:519-528, 1962.
- Buchanan, R., Kraag, G., Rosenthal, D. & Singal, D.P.: HLA Antigens and psoriatic arthritis. *Transplantation Proceedings*, vol 9, no 4 (december), 1977.
- Buchner, A. & Begleiter, A.: Oral lesions in psoriatic patients. *Oral Surg.*, 41:327-332, 1976.

Burch, P.R.J. & Rowell, N.R.: Psoriasis: aetiological aspects, *Acta Derm. vener.*,45:366-380,1965.

Christophers, E. & Braun-Falco, O.: Psoriatic hyperplasia: some measurements. *Br. J. Derm.*,83:63-68,1970.

Comaish, S.: Autoradiographic studies of hair growth in various dermatoses. *Br. J. Derm.*,81:283-288,1969.

Cox, A.J.: The dermal-epidermal junction in psoriasis. *J. Invest. Derm.*,53:428-435,1969.

Cox, A.J. & Watson, W.: Histologic variations in lesions of psoriasis. *Arch. Dermatol.*,106:503-506,1972.

Eckes, L., Ananthakrishnan, R. & Walter, H.: Zur geographischen Verteilung der Psoriasis. *Hautarzt*,26:563-567,1975.

El-Zawahry, M.: Mucosal and lingual psoriasis. *Arch. Dermatol.*,108:275,1973.

Farber, E.M. & Cox, A.J.: psoriasis, proceedings of the third international symposium, pag.285-291,1981.

Farber, E.M., Nall, M.L. & Watson, W.: Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch. Dermatol.*,109:207-211, 1974.

Farber, E.M. & Peterson, J.B.: Variations in the natural history of psoriasis. *Calif. Med.*,95:6-11,1969.

Fischman, S.L., Barnet, M.L. & Nisengard, R.J.: Histopathologic, ultrastructural and immunologic findings in an oral psoriatic lesion. *Oral Surg.*,44:253-260,1977.

Fry, L. & Mc Minn, R.M.H.: Observation on mitosis in psoriatic epidermis. *Br. J. Derm.*,82:19-22,1970.

Ganor, S.: Diseases sometimes associated with psoriasis 1 and 2.: *Dermatologica*,154:268-272 and 338-341,1977.

Gommans, J.M., Bergers, M., van Erp, P., van den Hurk, J., Mier, P.D. & Roelfzema, H.: Studies on the plasma membrane of normal and psoriatic keratinocytes. *Br. J. Derm.*,101: 407-412,1979.

Greither, A.:Psoriasis: Eine Allgemeinkrankheit ?. *Hautarzt*, 28:5-9,1977.

Guilhou, J.J., Meynadier, J., Clot, J., Charmasson, E., Dardenne, M. & Brochier, J.: Immunological aspects of psoriasis. *Br.J.Derm.*,95:295-301,1976.

Halprin, K.M.: Epidermal "turnover time"- a re-examination. *Br. J. Derm.*,86:14-19,1972.

Hellgren, L.: Psoriasis. Statistical, clinical and laboratory investigation of 255 psoriatics and matched healthy controls. Acta Dermatovener. (Stockholm), 44:191-207, 1964.

Hellgren, L.: Psoriasis in total population in Sweden. Almquite Wiksel, Stockholm, 1967.

Herrman, F., Steigleder, G.K., Kamei, Y. & Kim, J.H.: Amino-peptidasen-Aktivität in der psoriatischen Papel. Derm. Wschr., 146:603-609, 1962.

Hoedemakers, H.C.M.: Statistisch-genetische analyse van atopie en psoriasis. Proefschrift Nijmegen, 1975.

Illig, L.: Die Morphogenese der Blutgefäß-Reaktion bei der Psoriasis vulgaris. Arch. klin. exp. Derm., 227:151-158, 1966.

Ingram, J.T.: The significance and management of psoriasis. Br. Med. J., 11:823-835, 1954.

Karvonen, J., Tillikainen, A. & Lassus, A.: HLA-antigens in patients with persistent palmoplantar pustulosis and pustular psoriasis. Ann. Clin. Res., 7:112-115, 1975.

Koebner, H.: Zur Aethiologie der Psoriasis. Vjschr. Derm. Syph., 4:203-207, 1877.

Krueger, C.C.: psoriasis: current concepts of its etiology and pathogenesis. in: Year book of dermatology 1981, blz 13-70, 1981.

Krulig, L., Farber, E.M., & Grumet, F.C.: Histocompatibility (HL-A) antigens in psoriasis. Arch. Dermatol., 111: 857-860, 1975.

Lerner, M.R. & Lerner, A.B.: Congenital psoriasis. Arch. Dermatol., 105:598-601, 1972.

Lever, W.F. & Schaumburg-Lever, G.: Histopathology of the skin. J.B. Lippincott Philadelphia-Toronto, 1975.

Lewin, K., De Wit, S. & Ferrington, R.A.: Pathology of the finger nail in psoriasis. Br. J. Derm., 86:555-563, 1972.

Lombolt, G.: Psoriasis prevalence, spontaneous course, and genetics: a census study on the prevalence of skin diseases on the Faroer Islands. Copenhagen, G.E.C. GAD, 1963.

Madden, J.F.: Histologic studies of uninvolved skin of patients with psoriasis. Arch. Derm. Syph., 44:655-664, 1941.

Mahrle, G.: Psoriasis vulgaris. Cytologie und Cytochemie einer benignen Epidermisproliferation. Proefschrift Göttingen, 1975.

- Marcusson, J., Möller, E. & Thyresson, N.: HL-A antigens (17, 27 UPS) in psoriasis with special reference to patients with arthritic lesions. *Acta Dermatovener.* (Stockholm), 55:297-300, 1975.
- Moll, J.M.H.: The Clinical spectrum of psoriatic arthritis. *Clin. Orthop.*, 143:66-75, 1979.
- Mom, A.M., Polak, M., Fabeiro, J.L. & Garibaldi, I.B.: The psoriatic myopathy, *Dermatologica*, 140:214-218, 1970.
- Niermann, H.: Neue Ergebnisse der Zwillingspathologischen Forschung. *Arch. klin. exp. Derm.*, 219:378-392, 1964.
- Neumann, E.: The nature and role of epidermal regressive changes in the development of the psoriatic lesion. *Acta Dermatovener.* (Stockholm), 58:481-486, 1978.
- Neumann, E. & Hard, S.: The significance of the epidermal sweat duct unit in the genesis of pustular psoriasis (Zumbusch) and the micro-abscess of Munro-Sabouraud. *Acta Dermatovener.* (Stockholm), 54:141-146, 1974.
- Novotny, F.: Liver changes in psoriasis. In: *Psoriasis, proceedings of the third International symposium*, pag. 327-328, 1981.
- Oppenheim, M.: Psoriasis mucosae oris. *Monatsschr. Prakt. Dermatol.*, 37:481-483, 1903.
- Orfanos, C., Mahrle, G. & Christenhusz, R.: Verhornungsstörungen am Haar bei Psoriasis. *Arch. klin. exp. Derm.*, 236:107-114, 1970.
- Penneys, N.S., Fulton, J.E., Weinstein, G.D. & Frost, P.: Location of proliferating cells in human epidermis. *Arch. Dermatol.*, 101:323-327, 1970.
- Pinkus, H.: Psoriasiform tissue reactions. *Australias J. Derm.*, 1:31-35, 1965.
- Pinkus, H. & Mehregan, A.H.: The primary histologic lesion of seborrhoeic dermatitis and psoriasis. *J. Invest. Derm.*, 46:109-116, 1966.
- Rowe, L.: Volume of epidermis and dermal papillae in psoriasis, actinic keratoses and lentigo. *J. Invest. Derm.*, 46:374-377, 1966.
- Rupic, M.: Zur Ultrastruktur der spongiform Pustel. *Arch. klin. exp. Derm.*, 239:30-49, 1970.
- Russel, T.J., Schultes, L.M. & Kuban, D.J.: Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *New Engl. J. Med.*, 287:738-740, 1972.

Soltani, K. & van Scott, E.J.: Patterns and sequence of tissue changes in incipient and evolving lesions of psoriasis. Arch. Dermatol.,106:484-490,1972.

Suurmond, D.: Histologic changes in treated and untreated psoriatic lesions. Dermatologica,131:357-366,1965.

Svejgaard, A., Nielsen, L.S., Svejgaard, E., Nielsen, F.K., Hjortshøj, A. & Zachariae, H.: HL-A in psoriasis vulgaris and in pustular psoriasis - population and family studies. Br. J. Derm.,91:145-153,1974.

Van Scott, E.J. & Ekel, T.M.: Kinetics of hyperplasia in psoriasis. Arch. Dermatol.,88:373-381,1963.

Watson, W., Cann, H.M., Farber, E.M. & Nall, M.L.: The genetics of psoriasis. Arch. Dermatol.,105:197-207,1972.

Weinstein, G.D. & McNutt, H.: Cell junctions. New Engl. Med. J.,286:521-524,1972.

Wohlrab, W.: Ueber die Histotopographie der Phosphomonoesterasen im Psoriasis-herd und dessen Umgebung. Arch. klin. exp. Derm.,217:471-479,1963.

Woodrow, J.C., Dave, V.K., Usher, N. & Anderson, J.: The HL-A system and psoriasis. Br. J. Derm.,92:427-436,1975.

Wyatt, E., Bottoms, E. & Comaish, S.H.: Abnormal hair shafts in psoriasis on scanning electron microscopy. Br. J. Derm.,87:368-373,1972.

LITERATUUROVERZICHT VAN DIVERSE METHODEN TER BESTUDERING
VAN DE CELPROLIFERATIE VAN NORMALE EN PSORIASIS EPIDERMIS.

- 2.1. Inleiding
- 2.2. Radioactief gemerkte aminozuren
- 2.3. Kleurstoffen
- 2.4. Histogeometrie
- 2.5.1. Mitotische index
- 2.5.2. Mitotische index na stathmokinetiesche stoffen
- 2.6. Autoradiografie
 - 2.6.1. Inleiding en methoden
 - 2.6.2. Labelling index
 - 2.6.3. Volgen van gemerkte cellen op hun weg door de diverse compartimenten van de epidermis
 - 2.6.4. Fraction labelled mitosis curve
 - 2.6.5. Dubbele labelling methode
 - 2.6.6. Continue labelling methode
 - 2.6.7. Tellen van granulae
- 2.7. Scintillatie telling
- 2.8. Cytofotometrie
 - 2.8.1. Statistische cytometrie
 - 2.8.2. Flowcytometrie
- 2.9. Samenvatting en discussie
- 2.10. Referenties

LITERATUUROVERZICHT VAN DIVERSE METHODEN TER BESTUDERING VAN DE CELPROLIFERATIE VAN NORMALE EN PSORIASIS EPIDERMIS.

2.1. INLEIDING.

De celproliferatie is sedert decennia onderwerp van intensieve research geweest met het doel een beter inzicht te krijgen in de fysiologie van normale en pathologische celreproductie. Een van de grootste celreproductie systemen in het menselijk lichaam is de epidermis. Deze kan men schematisch voorstellen als bestaande uit drie compartimenten. De klassieke theorie aangaande de wijze waarop, onder normale omstandigheden, de epidermale regeneratie geschiedt is in 1927 door F. Pinkus voorgesteld: Het cellululaire materiaal dat aan het oppervlak van het stratum corneum verloren gaat wordt vervangen door nieuwe cellen die in de basale laag door deling van de daar aanwezige cellen ontstaan (zie H. Pinkus, 1952).

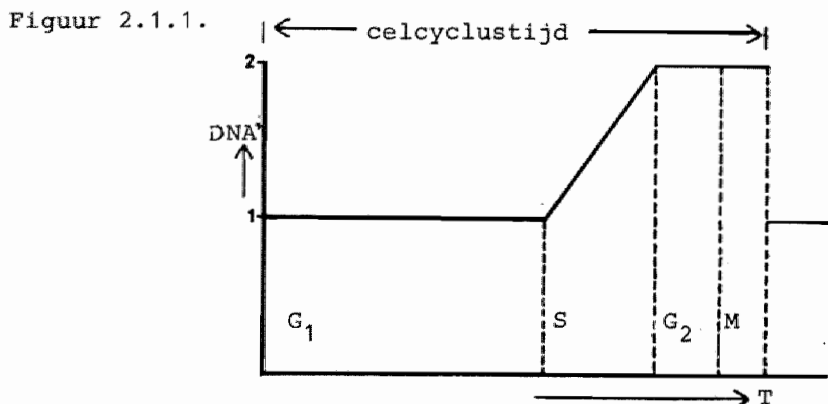
Celdeling en derhalve celproductie vindt plaats in de basale en suprabasale cellagen (proliferatieve celpopulatie, compartiment 1). De huidige kennis van de celproliferatie is gebaseerd op het concept van de celcyclus (Howard & Pelc, 1953). De celcyclus wordt gedefiniëerd als het interval tussen de voltooiing van de mitose in een cel en het einde van de telophase van de volgende mitose in een dochtercel. Tijdens de celcyclus doorloopt de cel een aantal stadia, waarin karakteristieke biochemische veranderingen plaatsvinden (Baserga, 1968, 1971). De celcyclus wordt verdeeld in vier fasen: de G_1 fase, S fase, G_2 fase en de mitose fase.

De G_1 fase is het interval tussen de voltooiing van de mitose en het begin van de DNA synthese. In deze periode worden ribonucleïnezuren en proteïnen voor de komende DNA replicatie gesynthetiseerd (Baserga, 1968). Cellen in de G_1 fase zijn gekenmerkt door een diploïde hoeveelheid DNA van de kern (2c DNA). Het absolute DNA gehalte van normale G_1 fase cellen is voor een individu constant (Vendrely, 1971). De S fase is de periode waarin de replicatie van het chromosomale DNA plaatsvindt. Doordat synthese van DNA alleen in deze fase van de celcyclus plaatsvindt kunnen cellen in de S fase herkenbaar gemaakt worden door inbouw van DNA-precursors. S fase cellen hebben een DNA gehalte van de kern dat ligt tussen 2c en 4c DNA, afhankelijk van het feit hoever de duplicatie van de chromosomen is voortgeschreden (Vendrely, 1971).

De G_2 fase is de post-synthetische pre-mitotische periode. De DNA synthese is voltooid en cellen in de G_2 fase zijn tetraploïd (4c DNA). In deze fase vindt synthese van RNA en proteïnen ter voorbereiding van de mitose plaats (Lipkin, 1971).

De M fase: de mitose fase is onderverdeeld in prophase, metaphase, anaphase en telophase. De mitose fase is microscopisch te herkennen door condensatie en scheiding van de chromosomen. Cellen in de mitose fase zijn tetraploid.

Figuur 2.1.1. geeft een schematische voorstelling van de hoeveelheid DNA van de kern van een cel die de celcyclus doorloopt.



Figuur 2.1.1.: Schematische voorstelling van de hoeveelheid DNA van de kern van een cel die de celcyclus doorloopt.

Nadat in de epidermis de celdeling is voltooid kan de nieuwgevormde basale cel opnieuw gaan prolifereren en wederom actief de celcyclus doorlopen of migreren naar het stratum spinosum, waarbij differentiatie optreedt en het vermogen tot proliferatie verloren gaat. De nieuwgevormde basale cel kan ook overgaan in een rustfase waarbij het vermogen tot celdeling behouden blijft. Deze fase wordt G_0 fase genoemd (Epifanova, 1969; Gelfant, 1976). Gelfant (1976) introduceerde het concept dat er in de epidermis twee categorieën niet circulerende G_0 cellen zijn. De eerste categorie zou geblokkeerd zijn in de G_1 fase van de celcyclus, de tweede categorie in de G_2 fase. Cellen in de G_0 fase kunnen na een specifieke stimulus terugkeren in de prolifererende populatie. Voor de basale laag van de muize-epidermis wordt het aandeel van de G_0 cellen op 10-20% geschat (Potten, 1975). Van de humane epidermis is de grootte van de G_0 fractie niet met zekerheid bekend (Pullmann, 1978). Een deel van de cellen in de prolifererende populatie migreren naar de rete Malpighi (compartiment 2). Tijdens dit migratieproces differentieren de cellen en verliezen hiermee het vermogen tot reproductie. Het derde compartiment van de epidermis is het stratum corneum (hoornlaag). In histologische coupes is dit compartiment gekenmerkt door verlies van cellulair detail, de afwezigheid van de kern of kernresten en door afplatting van de cellen. De hoornlaag is niet in staat metabole activiteiten, die karakteristiek

zijn voor de levende epidermiscellen, te ontplooiën en wordt derhalve beschouwd als het niet-levende eindproduct van de epidermale celdifferentiatie.

De turnovertijd van een weefselcompartiment is de tijd die nodig is om alle cellen van dat compartiment te vervangen, ofwel door influx, ofwel door mitose, of door beide. Wanneer alle cellen van een compartiment prolifereren en er geen influx is, is de turnovertijd gelijk aan de celcyclus-tijd. Voor een compartiment zonder celdeling en met een uniforme beweging in en uit het compartiment is de turnovertijd gelijk aan de transittijd. De transittijd is de tijd die een cel nodig heeft om een compartiment te doorlopen. Onder de proliferatie-snelheid (birth rate = proliferation rate) wordt verstaan de celproductie per cel of per compartiment.

Het onderzoek naar de celkinetische aspecten van normale en pathologisch veranderde epidermiscellen kan aan elk van deze compartimenten worden uitgevoerd. Celkinetische informatie op het niveau van de celcyclus van de prolifererende celpopulatie wordt verkregen door het bepalen van de mitotische index, al dan niet na stathmokinesis, bepaalde autografische methoden en de cytometrische methoden. Door toediening van radioactief gelabelde aminozuren kan men de turnovertijd van het levend epitheel en het stratum corneum bepalen. De turnovertijd van compartiment 1 en 2 kan men onderzoeken door toediening van radioactieve DNA-precursors. De turnover-tijd van het stratum corneum kan worden bepaald door applicatie van kleurstoffen op de huid. Indirect kan op deze wijze ook inzicht worden verkregen in de celproliferatie van het onderliggende levende epitheel. De histogeometrie is een op zichzelf staande benaderingswijze waarbij dynamische aspecten met histologische methoden worden bestudeerd.

Naast bovengenoemde bestaan er nog meerdere celkinetische parameters die m.n. in de tumorresearch worden gebruikt. Daar deze buiten het kader van dit proefschrift vallen worden zij hier niet besproken. In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van verschillende celkinetische methoden om inzicht te krijgen in de wijze waarop de weefsel- en celreproductie van de normale en psoriasis epidermis zich afspeelt.

2.2. RADIOACTIEF GELABELDE AMINOZUREN.

De turnovertijd van het stratum corneum en van het levend epitheel is door Rothberg et al. (1961) onderzocht met behulp van radioactief glycine. Na i.v. toediening van C^{14} -glycine treedt, nadat het aminozuur via diffusie in de epidermis is gekomen, inbouw op in de proteïnen van de epidermiscellen. Met behulp van chromatografie bepaalden deze auteurs de hoeveelheid glycine in schraapsels van normale en psoriasis epidermis als functie van de tijd. Vervolgens werd de specifieke activiteit bepaald.

De schraapsel van normaal stratum corneum verschijnt het eerste proteïne dat gelabeld glycine bevat 14 dagen na de initiële incorporatie. De maximale specifieke activiteit wordt vervolgens zichtbaar als een scherpe piek op de 26-28 dag. In de proteïnen van psoriasis-schilfers vertoont het geïsoleerde glycine een maximale specifieke activiteit op de derde dag (Rothberg et al., 1961).

Bovengenoemde auteurs baseren op deze gegevens een turnovertijd voor het stratum corneum van 14 dagen en een turnovertijd van 28 dagen voor de gehele normale epidermis. Hierbij gaan Rothberg et al. ervan uit dat het gelabelde glycine als een scherpe band in de basale laag wordt geïncorporeerd. Gezien de verschillen in piekactiviteiten na intradermale injectie van gelabeld glycine en methionine (Porter & Shuster, 1967) en de bevinding van Fukuyama et al. (1965) dat glycine voornamelijk in de bovenste cellagen van de levende epidermis wordt ingebouwd, lijkt deze veronderstelling onjuist.

Deze turnovertijd van 14 dagen voor het normale stratum corneum is door Porter & Shuster (1967) eveneens met behulp van C^{14} -glycine en door Frost et al. (1966) met behulp van H^3 -glycine bevestigd.

2.3. KLEURSTOFFEN.

De turnovertijd van het stratum corneum is met behulp van kleurstoffen voor het eerst bepaald door Sutton. Na de hoornlaag met zilvernitraat gekleurd te hebben bepaalde hij de tijd die nodig was voor het verdwijnen van de kleurstof (Sutton, 1938).

Baker & Kligman (1967) gebruiken tetrachloorsalicylanilide (TCSA), een fluorescerende kleurstof, die nog in zeer kleine hoeveelheden door het menselijk oog onder Woods licht kan worden gezien en die alleen het stratum corneum kleurt, doch het levend epitheel niet binnendringt. De turnovertijd van het stratum corneum is rechtevenredig met het aantal cellagen van het stratum corneum. Aan de andere kant is deze turnovertijd omgekeerd evenredig met de productie onder een bepaalde oppervlak.

Baker & Kligman (1967) vinden een turnovertijd van 15 dagen voor het stratum corneum van een normale epidermis op de rug. Zij berekenen tevens dat er, op grond van het aantal cellagen

en de turnovertijd van het stratum corneum, geen productiever verschillen zijn tussen rug, arm en abdomen. Het voorhoofd daarentegen vertoont een hogere productie. TCSA kleurt eveneens snel de parakertotische hoornlaag bij psoriasis. Bij psoriasis verdwijnt de fluorescentie binnen 2-4 dagen (Baker & Kligman, 1967).

Bij het beoordelen van deze cijfers moet rekening worden gehouden met het feit, dat zowel zilvernitraat als TCSA sterk irriterende stoffen zijn, waardoor zij de mitotische activiteit van de epidermis vergroten (Pinkus, 1952; Brophy & Lobitz, 1959).

Met dansylchloride, een niet irriterende fluorescerende kleurstof, berekenen Jansen et al. (1974) een turnovertijd van 12-15 dagen voor normaal stratum corneum. Voor het voorhoofd bedraagt deze tijd ruim acht dagen. Een versnelde turnovertijd voor de hoornlaag van de hoofdhuid wordt ook gevonden door Plewig et al. (1971). Op oudere leeftijd is de turnovertijd volgens Baker & Blair (1968) verlengd, doordat de productie per tijdseenheid vertraagd is.

Uitgaande van bovengenoemde turnovertijd van het stratum corneum berekenen Bergstresser & Taylor (1977) de turnovertijd van de levende epidermis. Hiertoe bepalen zij het aantal cellagen van het stratum corneum, de oppervlakte van een corneocyten en het aantal keratinocyten onder 1 mm² huid. Op deze wijze berekenen zij een turnovertijd voor de levende epidermis van 31 dagen.

Deze benaderingswijze heeft het nadeel dat eventuele fouten in de parameters met elkaar worden vermenigvuldigd. Wanneer wij echter, uitgaande van de door Bergstresser & Taylor (1977) bepaalde turnovertijd van 31 dagen voor de totale levende epidermis een verhouding proliferatieve tot non-proliferatieve cellen van 2,2 : 1 (Halprin, 1972) aannemen, bedraagt de celcyclustijd van de proliferatieve celpopulatie 236 uur. Deze waarde ligt binnen het spreidingsgebied van celcyclustijden, zoals deze, berekend met andere methoden, in de literatuur worden vermeld.

2.4. HISTOGEOMETRIE.

Een geheel andere benaderingswijze van de celkinetische problematiek van normale en psoriasis epidermis is gekozen door Van Scott & Ekel (1963). Via directe planimetrische metingen in serie-coupees onder het microscoop berekenen zij dat het volume epidermis per eenheid oppervlakte van het huidoppervlak bij psoriasis ruim 4 maal het volume van normale epidermis was. Tevens was volgens deze auteurs het aantal mitosen per eenheid huidoppervlak bij psoriasis 27 maal zo groot als in normale epidermis. Deze toename van het aantal mitosen berust op de vergroting van het basale membraan oppervlak ten gevolge van de uitgroei van de dermale papillen. Bovendien speelt het voorkomen van mitosen in meerdere cellagen van de

epidermis dan bij normale huid het geval is een belangrijke rol.

Uitgaande van de door Rothberg et al. (1961) berekende turn-overtijd van 28 dagen voor normale epidermis berekenen Van Scott & Ekel een turnovertijd voor de epidermis bij psoriasis van 4 dagen.

De berekening van Van Scott & Ekel is, afgezien van mogelijke methodieke fouten, onjuist omdat de door Rothberg et al. (1961) beschreven 28 dagen betrekking hebben op de turnovertijd van het stratum corneum (14 dagen) en de levende epidermis (14 dagen). Op grond van de gegevens van Van Scott & Ekel zou de turnovertijd van de epidermis bij psoriasis dan ruim 2 dagen bedragen. Deze 2 dagen zijn tenslotte alleen juist indien de celcyclustijd van de psoriasiscel gelijk is aan die van de normale epidermiscel.

Van Scott & Ekel (1963) vinden bovendien een proportionele relatie tussen de grootte van de dermale papillen en de grootte van de populatie prolifererende cellen boven deze papillen. Deze relatie blijft behouden als de dermale papillen bij psoriasis groter worden.

2.5.1. MITOTISCHE INDEX.

De mitose is microscopisch te herkennen door condensatie en scheiding van de chromosomen tijdens de prophase, metaphase, anaphase en telophase. De mitotische index (M.I.) is het aantal mitosen in de basale celpopulatie gerelateerd aan het totale aantal in de interfase verkerende basale cellen of aan het totale aantal levende epidermiscellen. De methode waarbij het aantal mitosen per eenheid lengte van de basale membraan wordt geteld is minder gewenst (Wright, 1977). De mitose snelheid is de M.I. per tijdseenheid.

Het meermalen tellen van dezelfde nucleus in diverse coupes kan met de formule van Abercrombie (1946) worden gecorrigeerd. Het microscopisch herkennen van late telophase-cellen en "clear cells" van Masson kan moeilijk zijn. Zo kunnen ook vroege prophase cellen soms moeilijk te onderscheiden zijn van gegranuleerde nuclei (Fisher & Wells, 1968). Bovengenoemde foutenbronnen, de arbeidsintensiviteit van het onderzoek en de subjectiviteit van de onderzoeker zijn de grootste nadelen van de methode. De M.I. methode wordt het meest toegepast wanneer relatieve metingen gewenst zijn, b.v. bij het vergelijken van de invloed van diverse stoffen op de turnovertijd van de epidermis.

Voor normale humane epidermis geeft tabel 2.5.1. een overzicht van diverse celkinetische data, zoals die door diverse auteurs met behulp van de M.I. methode zijn gevonden. De turnovertijd van de levende epidermis kan worden berekend uit de M.I. en de duur van de mitosefase.

Tabel 2.5.1.

AUTEUR	M.I.	T.T.	PLAATS
Thuringer, 1928	0,04	-	hoofd
	0,4	-	preputium
Cooper, 1939	0,15-0,68	-	preputium
Hoffman, 1949	0,01	257	arm
Pinkus, 1952	0,16	26,7	onderarm
Katzberg, 1952	0,02	100	abdomen
	0,16	13	onderarm
Brophy & Lobitz, 1959	0,08	-	rug
Fisher, 1968	0,01-0,09	-	-
Rowe et al., 1978	0,15-0,24	-	-

Tabel 2.5.1.: Overzicht van een aantal in de literatuur opgegeven waarden voor mitotische index (M.I.) in procenten en turnovertijd (T.T.) in dagen van normale humane epidermis voor enkele plaatsen op het lichaam.

De met behulp van de M.I. berekende turnovertijden voor normale epidermis variëren van 13 (Katzberg, 1952) tot 257 (Hoffmann, 1949) dagen afhankelijk van de gevonden mitotische indices en de geschatte mitoseduur. De in de literatuur opgegeven waarden voor de M.I. zijn niet zonder meer met elkaar te vergelijken, omdat niet alle auteurs het aantal getelde mitosen relateren aan dezelfde celpopulatie.

De M.I. van een psoriasislaesie is sterk verhoogd (Fisher, 1968; Weinstein & Forst, 1968; Fry & McMinn, 1970; Kaidby & Kurban, 1971). Er bestaan aanzienlijke verschillen in mitose aantal tussen diverse psoriasis patienten (Fry & McMinn, 1968). De spreiding tussen de patienten is echter significant groter dan de spreiding tussen diverse plaatsen op het lichaam bij dezelfde patient (Fry & McMinn, 1970).

Over het al dan niet bestaan van schommelingen in de M.I. in de loop van de dag (Diurnal variation) heerst geen eensluidende opinie.

Milstein & Cornel (1973) alsmede Fry & McMinn (1973) vinden deze variatie noch in normale epidermis noch bij psoriasis. Cooper (1939), Scheving (1953) en Fisher (1968) vinden een piek in mitotische activiteit van een normale epidermis in de ochtenduren terwijl Rowe et al. (1978) vinden dat het aantal mitosefiguren in normale epidermis 's middags hoger is dan 's ochtends. Hell & Hodgson (1966) en Pullmann et al. (1974) vinden daarentegen geen variaties in de normale echter wel in de psoriasis epidermis.

2.5.2. MITOTISCHE INDEX NA STATHMOKINETISCHE STOFFEN.

Colchicine blokkeert de in de mitosefase verkerende cel in de metaphase (Dustin, 1936; Brues, 1936; Ludford, 1936; Bucher, 1939), terwijl de cellen niet worden gehinderd de mitose te beginnen. Er treedt geen interferentie op met cellen in de prophase, noch is er enige invloed op de duur van de prophase, terwijl alle cellen in de metaphase worden geblokkeerd (Stevens-Hooper, 1961). Colchicine werd aanvankelijk gebruikt om de plaats van de normale celdeling te onderzoeken. Vervolgens is colchicine toegepast bij het onderzoek naar de mate van proliferatie van het darmepitheel van ratten (Leblond & Stevens, 1948) en katten (McMinn, 1954), alveolicellen (Bertanlanffy & Leblond, 1953) en blaasepitheelcellen (Vulpé, 1954).

De mate van toename van de in de metaphase geblokkeerde M.I. per tijdseenheid wordt "mitotic rate" genoemd (Stevens-Hooper, 1961). Uit de combinatie van M.I. en mitotic rate is met de Stevens-Hooper formule de duur van de mitosefase te berekenen.

Fisher & Wells (1968) vinden een mitotic rate, gemeten over een tijdsbestek van vijf uur, van 1,2 resp. 1,4 mitosen per 1000 levende epidermiscellen in de normale epidermis van volwassen vrouwen resp. mannen. Hieruit berekenen zij een mitoseduur van ongeveer 90 minuten. De epidermale mitotic rate in psoriasislaesies is 3-4 maal groter dan in normale epidermis. De duur van de mitosefase van een psoriasiscel bedraagt volgens deze auteurs ongeveer vier uur vergeleken met de $1\frac{1}{2}$ uur van een normale epidermiscel (Fisher & Wells, 1968).

Vincristine sulfaat (Oncovin^R) geeft in een dosering van 1 μ g intradermaal eveneens een optimale blokkade in de metaphase, zonder dat er een belangrijk toxisch effect van vincristine op de delende cel optreedt (Duffill et al., 1977). De mitotic rate van epidermiscellen in een psoriasislaesie bedraagt volgens Duffill et al. (1976), gemeten over een periode van $2\frac{1}{2}$ uur, 13 cellen per 1000 germinatieve cellen per uur. Hieruit berekenen deze auteurs een metaphaseduur van 30 minuten, terwijl de duur van de totale mitose 37 minuten zou bedragen.

De twee bovengenoemde research-groepen vinden twee niet met elkaar in overeenstemming zijnde waarden voor de duur van de mitosefase van epidermale psoriasiscellen. De verschillen berusten op uiteenlopende waarden die voor de mitotische indices voor en na toediening van de stathmokinetiche stof zijn gevonden. Mogelijk speelt de niet-gelijke wijze van toedienen van de stathmokinetiche stof een belangrijke rol hierbij.

2.6. AUTORADIOGRAFIE.

2.6.1. INLEIDING EN METHODEN.

Het percentage cellen in de S fase van de celcyclus is een belangrijke parameter voor de mate van proliferatie van een celpopulatie. Bij voorkeur wordt voor het bestuderen van deze parameter gebruik gemaakt van thymidine, een obligatoire DNA-precursor, als dragersubstantie. Thymidine laat zich met tritium (H^3), zonnig in diverse concentraties (Heenen, 1971), of met radioactief koolstof (C^{14}) markeren. Na inbouw in het DNA kan dit gelabeld thymidine worden aangetoond door de dwarsgesneden huidcoupes te bedekken met een fotografische emulsie, deze enige tijd te exponeren aan het isotoop om vervolgens de coupes te ontwikkelen en op de gebruikelijke manier te kleuren (Joftes, 1963). Na intradermale injectie verschijnen de eerste gemerkte nuclei in de epidermis na ongeveer 40 tot 60 minuten (Epstein & Maibach, 1965). Gelabelde mitosefiguren verschijnen 12 uur na de injectie (Weinstein & Van Scott, 1965). Na 2 celcycli kunnen nog gelabelde cellen worden gezien, een derde mitose reduceert de hoeveelheid gelabeld DNA tot onder de gevoeligheid van de autoradiografische film (Greulich, 1964).

Bij het onderzoek van de epidermis kan radioactief thymidine zowel in vitro (Hell & Hodgson, 1966; Braun-Falco et al., 1967; Kaidby & Kurban, 1971; Pullmann et al., 1974; Marks, 1978) als in vivo (Epstein & Maibach, 1965; Weinstein, 1965; Weinstein & Forst, 1968; Fry & McMinn, 1966; Goodwin et al., 1974) worden toegepast. Gezien de lange halfwaarde tijden van de isotopen (H^3 : 12,3 jaar en C^{14} : 5556 jaar) is toepassing bij mensen aan grenzen gebonden. De tijdsduur die verloopt tussen het afnemen van het monster en de beoordeling door de onderzoeker bedraagt bij het standaard autoradiografisch onderzoek 2-3 weken en is hiermee, samen met de arbeidsintensiviteit, het grootste nadeel van de methode. Bovendien kan door inbouw van een isotoop in de te onderzoeken cellen de proliferatieve activiteit van deze cellen worden beïnvloed.

Met behulp van autoradiografie kan de celkinetiek worden bestudeerd door de labelling index (2.6.2.) te bepalen, door de tijd te registreren die de gemerkte cellen op hun weg door de epidermis voor de diverse celcompartimenten nodig hebben (2.6.3.), door na een kortdurende toediening van het isotoop het aantal gelabelde mitosen grafisch uit te zetten als functie van de tijd (2.6.4.) of door de populatie twee maal met een korte tussenpauze gelabeld thymidine aan te bieden (2.6.5.). Ook kan door continue toediening van het isotoop (2.6.6.) of door de intensiteit van de labelling te meten (2.6.7.) inzicht worden verkregen in celkinetische parameters.

2.6.2. LABELLING INDEX.

De labelling index (L.I.) is het aantal gelabelde cellen in een populatie gerelateerd aan het totale aantal cellen van die populatie. Het concept van de L.I. is gelijk aan dat van de M.I. met dien verstande dat de L.I. verscheidene malen groter is dan de M.I. omdat de duur van de DNA synthesefase verscheidene malen groter is dan de mitoseduur (Howard & Pelc 1953; Quastler & Sherman, 1959). De L.I. geeft de fractie van de celpopulatie in de S fase aan ten tijde van de toediening van het isotoop.

Door meerdere auteurs zijn de labelling indices van normale humane epidermis, van klinisch normale epidermis van personen met psoriasis en van psoriasislaesies bepaald. De gevonden resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 2.6.2.1.

Auteur	Labelling index		
	Normale epi- dermis	Klinisch nor- male epidermis bij psoriasis	Psoriasis laesie
Kaku et al., 1964	7	-	-
Epstein & Maibach, 1965	4,9	-	-
Hell & Hodgson, 1966	0,9	2,7	4,1
Christophers & Schaum- löffel, 1967	3,3	-	-
Weinstein & Forst, 1968	5,2	-	22,7
Kaidby & Kurban, 1971	2,3	4,6	-
Steigleder et al., 1973	2,0	-	8,8
Weinstein et al., 1973	3,5	-	-
Heenen et al., 1973	4,8	-	-
Pullmann et al., 1974	2,4	-	13,6
Chopra & Flaxman, 1974	10,5	-	12,0
Goodwin et al., 1974	0,9	1,8	11,0
Allegra & De Panfilis, 1974	3,7	-	-
Duffill et al., 1976	-	-	10,3
Pullmann, 1978	2,8	5,7	10,6

Tabel 2.6.2.1.: Overzicht van een aantal in de literatuur opgegeven waarden voor de labelling indices van normale humane epidermis, klinisch normale epidermis bij psoriasis en van epidermiscellen uit een psoriasislaesie, uitgedrukt in procenten.

Vergelijking van deze indices wordt bemoeilijkt door het feit dat een aantal auteurs de populatie waaraan zij het aantal gelabelde cellen relateren niet expliciet omschrijven.

Alle auteurs vinden dat de L.I. bij psoriasis verhoogd is vergeleken met normale epidermis. Het sterk afwijkende percentage van Weinstein & Frost (1968) berust voor een deel op het toepassen van een correctiefactor door deze onderzoekers voor de korte reikwijdte van de b-partikels in de coupes. Het is echter omstreden of toepassing van deze factor, die ook door Iversen & Evensen (1962) wordt onderschreven, juist is gezien de bevindingen van Gelfant (1961) die geen verschil in L.I. vindt in 2μ en 7μ histologische coupes van dezelfde epidermis.

Ook het percentage cellen in de S fase is in klinisch normale huid verhoogd vergeleken met normale epidermis.

Om met behulp van de L.I. celcyclustijden te berekenen is het noodzakelijk de duur van de S fase te kennen. Deze tijd kan men bepalen met behulp van het percentage gelabelde mitosen als functie van de tijd (FLM curve, zie 2.6.4.) of door dubbele labelling technieken (zie 2.6.5.).

Ook de M.I. is bij psoriasis verhoogd. Volgens Goodwin et al., (1973) is er echter een duidelijke discrepantie tussen de toename van de M.I. en de L.I. bij psoriasis vergeleken met normale epidermis. Deze auteurs vinden dat de ratio van mitosen en DNA synthetiserende cellen groter is bij psoriasis dan die bij klinisch normale epidermis, die op zijn beurt weer groter is dan bij normale epidermis. Aangezien de formule $M.I.:L.I.=T_m:T_s$ geldt kan deze stijging in ratio het gevolg zijn van een langer worden van T_m , zoals Fisher & Wells (1968) hebben gevonden, of van een kortere T_s , zoals Weinstein & Frost (1968) vonden. Een combinatie van beide tijdsveranderingen is de derde mogelijkheid.

2.6.3. HET VOLGEN VAN GEMERKTE CELLEN OP HUN WEG DOOR DE DIVERSE COMPARTIMENTEN VAN DE EPIDERMIS.

Door het met korte tussenpauzen nemen van biosieën na intradermale injectie van H^3 -thymidine is het mogelijk de progressie van gemerkte cellen in de epidermis te volgen. Aldus krijgt men inzicht in de tijd die verloopt alvorens een in de basale laag gemerkte cel de buitenste laag van het epiteel bereikt.

Uit de onderzoekingen van Epstein & Maibach (1965) blijkt dat 24 uur na intradermale injectie van H^3 -thymidine in een normale humane epidermis de gemerkte nuclei juist boven de basale laag zijn gelocaliseerd. Na 7 dagen bevindt zich het merendeel van de gemerkte cellen in de middelste lagen van de epidermis, terwijl de eerste gemerkte cellen na 10-14 dagen in het stratum granulosum verschijnen. Deze laatste waarden stemmen overeen met de door Weinstein & Van Scott (1965) gevonden 13 dagen. Daarentegen vinden Kaku et al. (1964) een tijd van 21 dagen alvorens de in de basale laag gemerkte cellen in de buitenste laag van de levende epidermis aankomen. Dit verschil in gevonden resultaten wordt mo-

gelijk veroorzaakt door het kleine aantal monsters dat door de laatste auteurs is onderzocht.

Deze methode is niet bruikbaar voor het bepalen van de turn-overtijd van het stratum corneum omdat in deze laag normaliter geen celkernen meer aanwezig zijn. In een psoriasis epidermis is het wel mogelijk de gemerkte parakeratotische cellen te volgen tot het moment waarop zij de buitenste lagen van het stratum corneum bereiken.

Weinstein & Van Scott (1965) vinden dat de passagetijd van een gemerkte cel door het levend epitheel van een psoriasislaesie 48 uur bedraagt, terwijl de cellen na 4 dagen in de buitenste lagen van de hoornlaag aankomen.

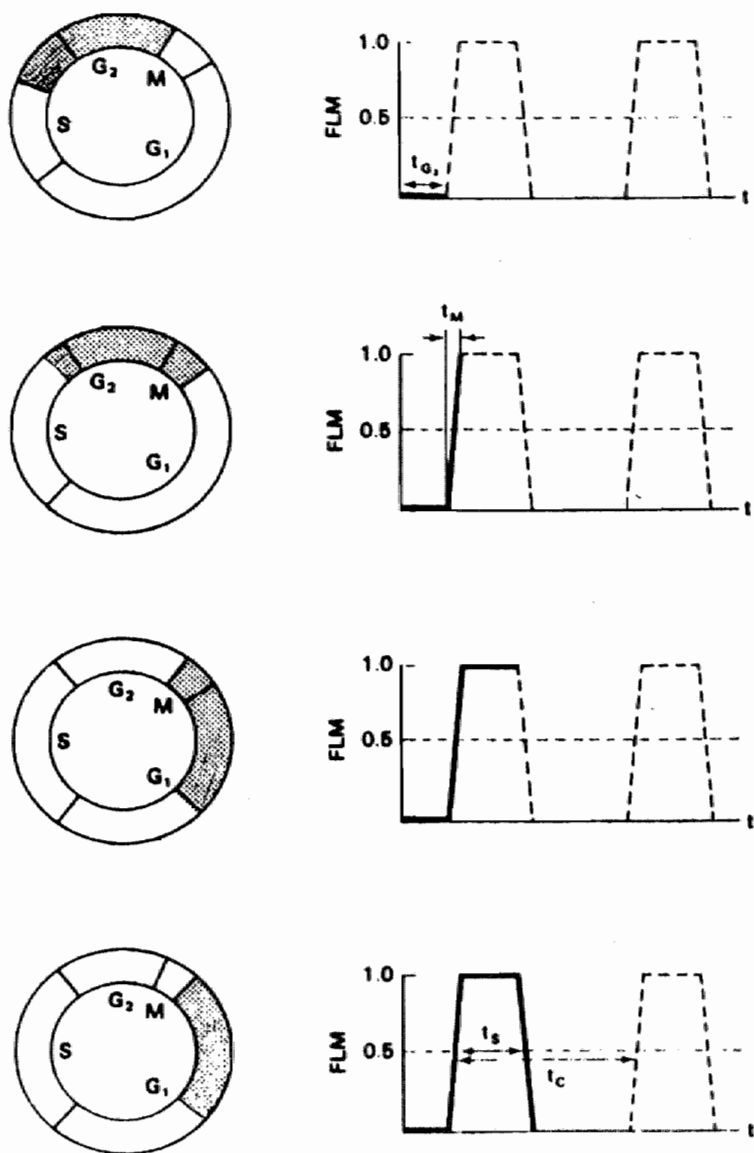
Bovengenoemde resultaten zijn echter niet direct vergelijkbaar met de met andere methoden gevonden tijden omdat hier geen gemiddelde maar een minimum turnovertijd wordt bepaald.

2.6.4. BEPALING VAN HET PERCENTAGE GELABELDE MITOSEN (FRACTION LABELLED MITOSIS, FLM).

Deze door Quastler & Sherman (1959) ontwikkelde methode is een van de eerste en nog steeds een van de meest informatieve van de isotopen methoden. Na toediening van een éénmalige dosis H^3 -thymidine wordt het percentage gelabelde mitosen met korte intervallen bepaald. Bij de grafische voorstelling van het percentage gemerkte mitosen als functie van de tijd ontstaat een curve met twee hellingen, waaruit men de duur van de celcyclus en zijn deelfasen kan bepalen. Hierbij komt de duur van de G_2 fase overeen met de tijd tussen de injectie van het thymidine en het verschijnen van de eerste gelabelde mitosen. De mitoseduur is het interval tussen het optreden van de eerste gemerkte mitosen en het tijdstip waarop alle mitosen zijn gemerkt. De DNA synthesetijd wordt door het interval tussen de 50%-punten van de stijgende en dalende helling van de FLM curve weergegeven. Een aantal auteurs geven de voorkeur aan de 37%-punten (Quastler, 1963; Takahashi, 1966). De duur van de totale celcyclus tenslotte wordt bepaald uit het verschijnen van gemerkte mitosen van de tweede celgeneratie. Figuur 2.6.4.1. geeft een schematische voorstelling van deze methode.

Voorwaarde voor het gelukken van deze methode is een niet te grote variabiliteit van de deelfasen van de celcyclus tussen de cellen van het prolifererende systeem (Lennartz, 1967; Gerecke et al., 1970). De lage proliferatiegraad in normale humane epidermis maakt het vrijwel onmogelijk met behulp van de FLM techniek directe metingen van basale celcyclus-tijden te verrichten (Wright, 1977). Deze problemen tracht men tegenwoordig te ondervangen door toepassing van bepaalde computerprogramma's (o.a. Gilbert, 1972).

Figuur 2.6.4.1.



Figuur 2.6.4.1.: Schematische voorstelling van de FLM methode (Vrij naar Aherne (1977)).

Omdat directe meting niet mogelijk was berekenden Weinstein & Frost (1968,1969) met behulp van de L.I. en de Ts uit de FLM curve een totale celcyclustijd voor de normale humane basale epidermiscellen van 308 uur. In 1973 echter wordt deze tijd door Weinstein & Mc Cullough op 457 uur bepaald. Nadere details over deze laatste waarde ontbreken omdat de auteurs verwijzen naar hun "unpublished data". Hiermee in tegenspraak is de enige ons in de literatuur bekende, op deze wijze berekende celcyclustijd van normale humane epidermis, die door Chopra & Flaxman (1974) is bepaald op 59 uur. Dit laatste onderzoek heeft echter in vitro plaatsgevonden. De gevonden waarden zijn in tabel 2.6.4.2. samengevat.

Tabel 2.6.4.2.

Auteur	Tc	Tg ₁	Ts	Tg ₂	Tm	L.I.
Weinstein & Frost, 1968	163	146	8,5	6-8	1	5,2
Weinstein & Frost, 1969	308	284	16	6-8	1	5,2
Weinstein & Mc Cullough, 1973	457					
Chopra & Flaxman, 1974	59	39	11,5	7	1,5	10,5

Tabel 2.6.4.2.: Overzicht van door diverse auteurs gevonden tijden in uren voor de celcyclus en zijn deelfasen van normale epidermis alsmede de gevonden labelling indices in procenten. Tc= totale celcyclustijd, Tg₁= duur van de G₁ fase, Ts= duur van de S fase, Tg₂= duur van de G₂ fase, Tm= duur van de mitosefase. L.I.= labelling index.

Ook over de celcyclustijd van een psoriasiscel bestaan in de literatuur tegenstrijdige opvattingen. Enerzijds zijn er de opvattingen van Weinstein en medewerkers (1968-1971) dat deze tijd 37,5 uur bedraagt. Goodwin et al. (1974) vinden daarentegen een totale celcyclustijd bij psoriasis van 91 uur. Chopra & Flaxman (1974) en Duffill et al. (1976) vinden intermediaire waarden. De bevindingen zijn samengevat in tabel 2.6.4.3.

Tabel 2.6.4.3.

Auteur	Tc	Tg ₁		Tg ₂	Tm	L.I.
Weinstein & Forst, 1968	37,5	24	8,5	4	0,3	22,7
Goodwin et al., 1974	91	73,5	9,8	7,2	0,5	11,0
Chopra & Flaxman, 1974	53,5	38,9	6,5	7	1,1	12,0
Duffill et al., 1976	56	±43	7,7	±5,6	-	10,3

Tabel 2.6.4.3.: Overzicht van door diverse auteurs berekende tijden in uren voor de totale celcyclus en zijn deelfasen, berekend met behulp van FLM curves, en de gevonden labelling indices (L.I.) in procenten van de prolifererende celpopulatie uit een psoriasislaesie. Tc= totale celcyclustijd, Tg₁= duur van de G₁ fase, Ts= duur van de S fase, Tg₂= duur van de G₂ fase, Tm= duur van de mitosefase.

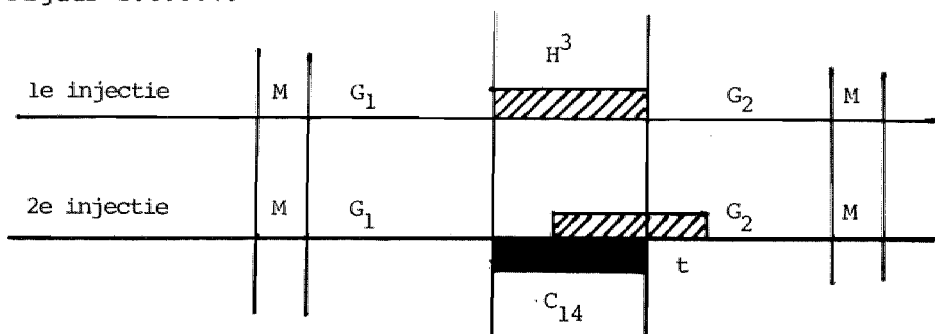
Alle auteurs hebben de totale celcyclustijd berekend uit de formule $N_s:T_s = N_{tot}:T_{tot}$. De al dan niet met behulp van computerprogramma's gevonden waarden voor Ts zijn niet bepalend voor de gevonden verschillen in celcyclustijd. Deze berusten op de uiteenlopende labelling indices. Het toepassen van een correctiefactor bij de bepaling van de L.I. door Weinstein en medewerkers is reeds elders besproken.

De door Weinstein vermelde celcyclustijd bij psoriasis vormde de rationele achtergrond voor de behandeling van psoriasis met cytostatica zoals methotrexaat (Weinstein, 1971; Weinstein & Mc Cullough, 1976). Jarenlang zijn deze celcyclustijden en de hierop gebaseerde therapeutische regimes officieel door de American Academy of Dermatology gesteund en onderschreven (Weinstein, 1973) en heeft het systemisch toedienen van methotrexaat bij de behandeling van psoriasis de goedkeuring van de F.D.A. (Roening et al., 1973; Weinstein et al., 1981).

2.6.5. DUBBELE LABELLING METHODE.

De S fase duur alsmede de celcyclustijd van de proliferatieve celpopulatie kan worden bepaald door de populatie met een korte tussenpauze tweemaal kortdurend gelabelde thymidine aan te bieden (Hilscher & Maurer, 1962; Wimbley & Quastler, 1963). De op de verschillende tijdstippen gemerkte cellen kunnen worden onderscheiden door toediening van verschillend hoge doses H^3 -thymidine of, bij voorkeur, van H^3 en C^{14} -thymidine. Deze beide isotopen zenden beta stralen van verschillende energie en reikwijdte uit (H^3 : $E_{\max} = 18$ KeV, $\bar{E} = 5$ KeV, reikwijdte in water 7μ ; C^{14} : $E_{\max} = 156$ KeV, $\bar{E} = 49$ KeV, reikwijdte in water 240μ). Beide stralingen kunnen door toepassing van geschikte foto-emulsies worden gedifferentieerd. In de autoradiografische preparaten wordt de fractie van de verschillend gelabelde nucleï van de gelabelde cellen in de basale laag van de epidermis bepaald. De duur van de S fase wordt berekend uit de verhouding van influx en efflux van de gelabelde cellen in en uit de S fase. De totale celcyclustijd wordt berekend uit de duur van de S fase en de L.I.. Figuur 2.6.5.1. geeft een schematische voorstelling van de methode.

Figuur 2.6.5.1.



Figuur 2.6.5.1.: (Vrij naar Pullmann (1978)). Bepaling van de duur van de S fase met behulp van de DLM. Met een interval van 1 uur, (t) wordt de populatie kortdurend met H^3 en vervolgens met C^{14} gemerkt thymidine aangeboden. Tijdens de eerste incubatie worden alle cellen, die zich in de S fase bevinden met H^3 -thymidine gemerkt. Na de tweede incubatie, met C^{14} -thymidine, blijven de cellen die in het interval t de S fase hebben verlaten (efflux) alleen met H^3 gemerkt, terwijl de cellen, die in dit tijdsbestek de S fase zijn binnengekomen (influx) alleen met C^{14} worden gemerkt. Met beide isotopen worden die cellen gemerkt, die tijdens de procedure in de S fase blijven. Uit de verhouding van alle C^{14} gelabelde cellen (alleen C^{14} ; resp. $C^{14}+H^3$) en het aantal cellen dat alleen met H^3 is gemerkt, kan de duur van de S fase worden berekend.

Met bovengenoemde methode is door Heenen & Galand (1971) een Ts van 10 uur en een totale celcyclustijd van de prolifererende celpopulatie in een normale humane epidermis van 213 uur berekend. Deze waarden stemmen in meerdere of mindere mate overeen met de met dezelfde methode verkregen gegevens van Christophers & Schaumlöffel (1967), Heenen et al. (1973), Steigleder et al. (1973), Allegra & De Panfilis (1974), Pullmann et al. (1974) en Pullmann (1978) voor normale humane epidermis. De diverse celkinetische parameters zijn in tabel 2.6.5.1. samengevat.

Tabel 2.6.5.1.

Auteur	Ts	Tc	L.I.
Christophers & Schaumlöffel, 1967	5,6	154	3,3
Heenen & Galand, 1971	10,0	213	4,8
Heenen et al., 1973	10,3	184	5,8
Steigleder et al., 1973	6,6	312	2,0
Pullmann et al., 1974	6,6	282	2,4
Allegra & De Panfilis, 1974	7,5	206	3,7
Pullmann, 1978	7,2	296	2,8

Tabel 2.6.5.1.: Overzicht van met behulp van de dubbele labelling methode gevonden waarden voor de duur van de DNA synthesefase in uren en de hieruit met behulp van de gevonden labelling indices berekende totale celcyclustijden in uren van de proliferatieve celpopulatie in normale epidermis. De labelling indices (L.I.) zijn weergegeven in procenten. Ts= duur S fase, Tc= totale celcyclustijd.

Ook bij onderzoeken met de dubbele labelling methode wordt bij psoriasis een kortere totale celcyclustijd gevonden dan bij normale epidermis (Steigleder et al., 1973; Pullmann et al., 1974; Pullmann, 1978). Tevens vinden deze onderzoekers dat de duur van de S fase bij psoriasis significant verlengd is. Tabel 2.6.5.2. geeft een samenvatting van de gevonden gegevens.

Tabel 2.6.5.2.

Auteur	Ts	Tc	L.I.
Steigleder et al., 1973	14,0	173	8,8
Pullmann et al., 1974	14,4	114	13,6
Pullmann, 1978	1) 13,6	146	10,6
	2) 19,9	202	11,1

Tabel 2.6.5.2.: Overzicht van met de dubbele labelling methode gevonden waarden voor de duur van de S fase in uren en de hieruit met behulp van de gevonden labelling indices berekende totale celcyclustijden in uren van psoriasis-cellen. Ts= duur S fase, Tc= totale celcyclustijd, L.I.= labelling index in procenten, 1)= volontwikkelde laesie, 2)= beginnende psoriasislaesie.

2.6.6. CONTINUE LABELLING METHODE.

Bij de continue labelling methode wordt de te onderzoeken celpopulatie blootgesteld aan een continue toediening van het label gedurende een langere periode. Dit kan in vivo worden bereikt door, ofwel herhaalde injecties met intervallen korter dan de S fase, zodat geen cel die de S fase passeert aan de labelling ontsnapt, of door continue infusie. Behalve het feit dat continue toediening van een isotoop bij mensen niet gewenst is, stelt deze methode de proefdieren ook bloot aan een ongewenste fysiologische stress. Het beste kan deze methode in vitro worden toegepast.

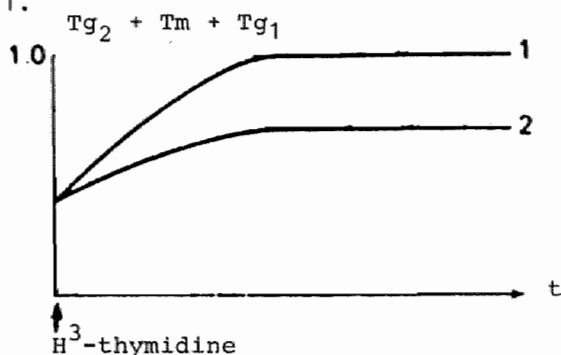
De L.I. als functie van de tijd wordt bepaald. Het tijdsinterval dat verloopt tussen toevoegen van het isotoop en het tijdstip waarop de fractie van gelabelde cellen een plateau bereiken is gelijk aan de celcyclustijd minus de tijdsduur van de S fase. In theorie kan de tijdspanne $Tg_2 + Tm + Tg_1$ nader worden bepaald in zijn componenten. Het tijdsinterval $Tg_2 + Tm$ is de tijd die nodig is om alle mitosen te merken. Uit het verschil kan Tg_1 worden bepaald. De duur van de S fase kan op meerdere manieren met behulp van de continue labelling methode worden berekend. De mate van toename van het aantal gelabelde cellen in de tijd, analoog aan de berekeningswijze bij stathmokinetic experimenten, is het meest rechtstreeks. Elegant is de combinatie van stathmokinesis en continue labelling zoals beschreven door Puck & Steffen (1963). Ook deze techniek is echter slechts geschikt voor in vitro onderzoek.

Een andere toepassing van de continue labelling methode vormt de berekening van de fractie cellen in de prolifererende populatie die de celcyclus niet doorlopen, maar deze hebben verlaten om in een rustfase te verkeren waaruit zij weer in de celcyclus kunnen terugkeren (G_0 cellen). Figuur 2.6.6.1. geeft een schematische voorstelling van de methode.

Ons zijn in de literatuur geen studies op dermatologisch gebied bekend waarbij celcyclustijden volgens deze methode worden berekend. Toepassing van deze methode bij het celkinetisch onderzoek van de epidermis stuit in vivo op ethische bezwaren, terwijl de voor de in vitro toepassing noodzakelijke kweektechnieken om een volwassen humane epidermis enkele dagen levend te houden nog onvoldoende zijn. Bovendien ontbreken in vitro een aantal mechanismen ter regulatie van de groei.

De groeifractie is het percentage cellen van de prolifererende basale en suprabasale celpopulatie dat de celcyclus daadwerkelijk doorloopt. Deze groeifractie is in vitro voor normale epidermis door Chopra & Flaxman (1974) op 66% na 3 dagen gesteld. Bij psoriasis vinden deze auteurs een groeifractie van 74% na 3 dagen in vitro. Weinstein (1971) daarentegen vindt in vivo bij psoriasis een groeifractie van vrijwel 100%. Voor normale humane epidermis in vivo is de groeifractie niet bekend.

Figuur 2.6.6.1.



Figuur 2.6.6.1.: Continue labelling methode: Bij het begin van het experiment zullen de cellen in de S fase het isotoop opnemen. In de tijd die hierop volgt zullen alle cellen die de S fase binnenkomen eveneens worden gelabeld. De labelling indices zullen derhalve in de tijd toenemen. Wanneer alle prolifererende cellen zijn gelabeld hebben de L.I. een plateau bereikt. De tijd tussen het moment van toedienen van het isotoop en het bereiken van het plateau is gelijk aan $Tg_2 + Tm + Tg_1$. Indien alle cellen in de populatie prolifereren stijgen de labelling indices in de tijd volgens lijn 1. Indien slechts een deel van de populatie aan de proliferatie deelneemt geschiedt de toename volgens lijn 2. Op deze wijze kan de groeifractie en derhalve het percentage G_0 cellen van de betrokken populatie worden bepaald. Figuur overgenomen uit Aherne (1977).

2.6.7. TELLEN VAN GRANULAE.

Bij alle tot nu toe beschreven autoradiografische technieken wordt het percentage gemerkte interfase cellen of gemerkte mitosen geteld. Onder bepaalde omstandigheden kan informatie worden verkregen door de intensiteit van de labelling te bepalen en na te gaan hoe deze intensiteit zich in het verloop van de tijd gedraagt. De intensiteit van de labelling wordt bepaald door het aantal korrels boven de gemerkte nuclei te tellen. Uit de halvering van het gemiddelde aantal korrels per nucleus kunnen diverse tijden van de celcycluscomponenten worden berekend (Killmann et al., 1963; Clarkson et al., 1967). Deze techniek is, in het bijzonder wanneer er een significante overgang van proliferatieve naar non-proliferatieve cellen bestaat, aanmerkelijk minder nauwkeurig dan b.v. FLM curves (Aherne et al., 1977).

Gegevens over celkinetisch onderzoek van de humane epidermis, berekend met behulp van deze methode, hebben wij in de ons bekende literatuur niet gevonden.

In vereenvoudigde vorm kan de methode wel informatie geven over de relatieve celcyclustijden omdat het aantal korrels per nucleus een maat vormt voor de synthesesnelheid per tijdseenheid. Op deze wijze hebben Born & Kalkoff (1969) gevonden dat het gemiddelde aantal korrels per gelabelde cel bij psoriasis met de helft is gereduceerd vergeleken met normale epidermis, terwijl de L.I. niet was veranderd. Deze auteurs concluderen hieruit dat de duur van de synthese fase met een factor 2 is verlengd. In klinisch normale huid van personen met psoriasis vinden zij eveneens een kleiner aantal korrels per gelabelde cel dan bij normale controle personen (Born & Kalkoff, 1969).

2.7. SCINTILLATIE TELLING.

Het is mogelijk de opname van aan thymidine gebonden isotopen op een andere wijze dan met autoradiografie te meten. Door de in oplossing gebrachte, te onderzoeken celpopulatie te mengen met een scintillatie vloeistof kan de hoeveelheid radioactiviteit in het monster worden bepaald, omdat de moleculen van het fluorescerende bestanddeel van de scintillatie vloeistof, wanneer zij getroffen worden door een tritium of C^{14} beta partikel, emissielicht uitzenden (Aherne et al., 1977). Deze methode geeft de gemiddelde incorporatie per cel. Het voordeel van de methode is de snelheid waarmee de resultaten worden verkregen en het grote aantal cellen dat kan worden gemeten. Het verlies van het zicht op de aparte cellen kan een nadeel zijn. Met deze methode is het niet mogelijk onderscheid te maken of een verandering in radioactiviteit het gevolg is van een verandering in het aantal cellen dat gemerkt thymidine opneemt of van een verandering in de hoeveelheid thymidine die door elke cel wordt opgenomen.

Toepassing van deze techniek bij het onderzoek naar de kinetiek van de humane epidermis lijkt ons niet zinvol.

2.8. CYTOPHOTOMETRIE.

De kwantitatieve cytospectrophotometrie is ontwikkeld door Caspersen (1936) uitgaande van de wet van Lambert-Beer, waarbij de absorptie van monochromatisch licht van een oplossing in een cuvette evenredig is met de concentratie van de chromofoor. De wet van Lambert-Beer toegepast in de cytochemie geeft aan dat de totale absorptie van een object onder het microscoop evenredig is met de totale hoeveelheid chromofoor in dat object. Hiervan afgeleid is de cytophotometrie waarbij een indirecte meting van de celcomponenten na kwantitatieve kleuring plaats vindt. Door gebruik te maken van fluorochromen ontstond de cytofluorophotometrie. Bij het onderzoek naar de celkinetiek bepaalt men als intracellulaire component het gehalte aan DNA. De cytophotometrie is onder te verdelen in de statische cytophotometrie en de flowcytometrie.

2.8.1. STATISCHE CYTOPHOTOMETRIE.

Bij de statische cytophotometrie wordt de te onderzoeken celpopulatie op een objectglas gebracht en wordt het DNA van de celkernen kwantitatief gekleurd. De absorptiewaarden van de Feulgen gekleurde cellen worden gemeten en vervolgens ingedeeld in DNA klassen. Door het aantal cellen dat binnen een bepaald DNA gebied wordt gevonden uit te zetten tegen de DNA waarden wordt een histogram verkregen. Aldus kan het percentage cellen in elke fase van de celcyclus worden bepaald. De relatieve duur van de fasen kan uit de zogemaakte DNA distributie worden bepaald. Door de duur van een van de fasen onafhankelijk te meten, kunnen absolute celcyclustijden worden berekend.

De absorptiewet van Lambert-Beer geldt echter niet voor niet homogeen gekleurde objecten zoals Feulgen gekleurde celkernen. In dat geval worden geen absorptiewaarden maar transmissiewaarden gemeten, waardoor een distributiefout optreedt (van Vloten, 1974). Aanvankelijk werd gemeten met een cytophotometer, gebaseerd op het twee-golflengten principe, ontwikkeld door Ornstein (1952) en Patau (1952) en vervolmaakt door Mendelsohn (1958), van Duijn (1966) en Cohn & van Duijn (1967), waarbij de distributiefout sterk wordt verkleind. Tegenwoordig wordt deze fout zo veel mogelijk geëlimineerd door het meetveld zo klein te kiezen, dat kan worden aangenomen dat de kleurstof hierin homogeen is verdeeld (Goldstein, 1970, 1971; van Vloten, 1974). De verdere nadelen zijn, naast de inhomogeniteit van het veld en de verschillen in achtergrondabsorptie, de arbeidsintensiviteit en de geringe statistische betrouwbaarheid van de methode. Bovendien veroorzaken beschadigde kernen te lage DNA waarden (Würthner et al., 1972). Om deze redenen is getracht het te onderzoeken weefsel te scheiden in aparte cellen of intacte nuclei. Als regel gebeurt dit door toediening van diverse enzymen gecombineerd met mechanische homogenisatie (Rinaldi, 1958; Giovanella & Heidelberger, 1969; Alavaikko, 1971; Schumann et al., 1971). Elke enzym-

tische of chemische methode heeft echter in meerdere of mindere mate decompositie van de te meten nucleinezuren tot gevolg (Filkuka et al., 1968; Franke et al., 1973; Haag et al., 1975).

De statische cytophotometrie is bij het onderzoek naar de celkinetiek van de epidermis toegepast door coupes te snijden van het huidbiopt (Grove et al., 1976) en door uitstrijkpreparaten te maken van een epidermale celsuspensie (Haag et al., 1975). Grove et al. (1976) vinden bij psoriasis een sterke toename van het aantal cellen in de S fase vergeleken met de normale epidermis, terwijl dit percentage bij klinisch normale huid van personen met psoriasis eveneens hoger, zij het in geringe mate, ligt dan bij normale epidermis. Haag et al. (1975) bestudeerden het DNA gehalte in geïsoleerde nuclei van humane epidermis cellen. Zij geven echter geen gedetailleerde analyse van de gevonden histogrammen. Beide metingen hebben betrekking op een relatief gering aantal cellen.

2.8.2. FLOWCYTOMETRIE.

Daar de statische cytometrie is gelimiteerd door het relatief geringe aantal cellen dat in een bepaalde tijdsduur kan worden onderzocht is in de jaren zestig een nieuwe methode ontwikkeld. Researchgroepen in de International Business Machines-Watson (Kamentsky et al., 1965), de Los Alamos Scientific Laboratory (Van Dilla et al., 1967, 1969; Mullaney et al., 1969), Stanford University (Hulett et al., 1969), Universität Münster (Dittrich & Göhde, 1969) en de Universität Freiburg (Sprenger et al., 1971) ontwikkelden de flowcytometrie waarbij de te meten cellen in een continue stroom het meetveld passeren. Ofschoon door bovengenoemde auteurs een scala aan diverse instrumentele ontwerpen werd gebruikt gaan ze alle uit van hetzelfde principe; de afzonderlijke cellen stromen achter elkaar door een bundel excitatie licht. Wanneer de cellen deze lichtstraal passeren, vinden fotometrische metingen van fluorescentie, absorptie of lichtverstrooiing of van verschillende combinaties van deze parameters plaats.

Flowcytometrie is het meest toegepast bij de fluorescentie meting van het cellulaire DNA gehalte. Voor deze kwantitatieve meting van de hoeveelheid DNA moeten de celkernen gekleurd worden met een fluorescerende kleurstof die zich specifiek en kwantitatief aan DNA bindt. Momenteel zijn er meerdere van deze fluorochromen beschikbaar. Gebaseerd op de Feulgen procedure zijn de fluorochromen Auramine O (Trujillo & Van Dilla, 1972) en Acriflavine (Kasten, 1959; Kraemer et al., 1972) alsmede de kleurstof Flavophosphine N (Crissman et al., 1975). RNA levert geen bijdrage aan de kleuring omdat het snel wordt verwijderd uit de cellen tijdens de zure hydrolyse (Ely & Ross, 1949). Door Le Pecq & Paoletti (1967) is ethidium bromide geïntroduceerd, een fluorochroom dat selectieve en kwantitatieve chelatievorming aangaat met de "double stranded" gebieden

van nucleinezuren. Na behandeling van de cellen met RNA-ase is ethidium bromide geschikt als kwantitatieve kleurstof voor DNA (Dittrich & Göhde, 1969). Analoom aan ethidium bromide is propidium jodide (Hudson et al., 1969). Het voor DNA zeer specifieke mithramycine is geïntroduceerd door Crissman & Tobey (1974). Mithramycine geeft geen significante interactie met RNA (Ward et al., 1965).

Flowcytometrie wordt toegepast bij het onderzoek naar de celkinetiek van prolifererende systemen, de tumordiagnostiek, de tumorresearch, de evaluatie van therapieën, chromosoomanalyse, porphyrine diagnostiek en op het terrein van de immunologie, enzymologie, histochemie en moleculaire biologie (Impulscytophotometrie, 1975; Pulsecytophotometry, part 1, 1975; part 2, 1976; part 3, 1978; part 4, 1979; part 5, 1980; part 6, 1982). Bij het onderzoek naar de kinetische aspecten van de normale en pathologisch veranderde humane epidermis is de flowcytometrie voor het eerst door Bauer & De Grood (1975) toegepast.

Het belangrijkste voordeel van de flowcytometrische methode is het grote aantal cellen dat geteld wordt waardoor de statistische betrouwbaarheid sterk verbetert. De tijdwinst en de objectiviteit zijn verdere voordelen. De belangrijkste nadelen van de methode zijn het verlies van directe observatie van de cellen en het verlies van celverband.

De laatste jaren heeft het onderzoek met behulp van de flowcytometer een grote vlucht genomen. De instrumentele ontwikkelingen waren uitgebreid en veelzijdig, hetgeen heeft geleid tot een grote uitbreiding van de toepassingen van deze techniek. De florissante groei van de flowcytometrie wordt op fraaie wijze geïllustreerd door het grote aantal internationale symposia gewijd aan deze techniek en zijn toepassingen.

2.9. SAMENVATTING EN DISCUSSIE.

De diverse methoden om celcyclustijden en turnovertijden van het levend epitheel en de totale epidermis te bepalen geven sterk uiteenlopende resultaten.

De door de diverse auteurs gevonden mitotische indices (2.5.1.) lopen zo sterk uiteen, terwijl bovendien de geschatte duur van de mitosefase sterk subjectief is, dat hieruit geen betrouwbare turnovertijden en celcyclustijden kunnen worden berekend. Wel staat vast dat de M.I. bij psoriasis sterk verhoogd is vergeleken met de normale epidermis.

Berekening van de mitoseduur uit de toename van de M.I. na stathmokinesis (2.5.2.) levert ook tegenstrijdige gegevens op. Fisher & Wells (1968) vinden een verlenging van de T_m , terwijl Duffill et al. (1976) een kortere T_m vinden bij psoriasis vergeleken met normale epidermis. Ook onderzoeken met behulp van andere technieken door diverse auteurs brengen hierin geen verbetering (tabel 2.9.1.).

Tabel 2.9.1.

Auteur	Methode	N	PS
Fisher & Wells, 1968	M.I. + stathmo- kinesis	90	240
Duffill et al., 1976	M.I. + stathmo- kinesis	-	37
	FLM.	±60	38
Weinstein & Frost, 1968	FLM.	60	18
Goodwin et al., 1974	FLM.	60	30
Pullmann, 1978	DL.	72	210

Tabel 2.9.1.: Overzicht van door diverse auteurs gevonden tijden voor de duur van de mitosefase in minuten bij normale (=N) en psoriasis epidermis (=PS). M.I.= mitotische index; FLM.= fraction labelled mitosis curve; DL.= dubbele labelling methode.

Meer overeenstemming bestaat er over de turnovertijd van het stratum corneum (tabel 2.9.2.). Berekening van de celcyclustijd van de proliferatieve celpopulatie uit de transitijd van het stratum corneum geeft waarden die niet tegenstrijdig zijn met de celcyclustijden berekend met autoradiografische methoden. Bij psoriasis is deze tijd sterk verkort.

Tabel 2.9.2.

Auteur	Methode	N	PS
Rothberg et al., 1961	C ¹⁴ -glycine	13-14	3-4
Frost et al., 1966	H ³ -glycine	12-14	-
Baker & Kligman, 1967	T.C.S.A.	12-15	-
Jansen et al., 1974	Dansylchloride	11-18	-
Weinstein & Van Scott, 1965	H ³ -thymidine	-	4

Tabel 2.9.2.: Overzicht van door diverse auteurs gevonden turnovertijden van het stratum corneum in dagen voor normale (=N) en psoriasis (=PS) epidermis.

Met behulp van radioactieve aminozuren is de turnovertijd van de totale epidermis bepaald op 28 dagen (Rothberg et al., 1961). Het is echter omstreden of het door deze auteurs

gebruikte aminozuur in de basale laag van de epidermis wordt ingebouwd.

De resultaten, verkregen met de histogeometrische benaderingswijze van Van Scott & Ekel (1963) stemmen slechts in die zin overeen met de met andere methoden verkregen resultaten, dat bij psoriasis de turnovertijd is versneld.

Het vervolgen van met radioactief thymidine gemerkte cellen op hun weg door de diverse strata van de levende epidermis geeft transittijden voor normale epidermis van 13-18 dagen (2.6.3.). Met deze methode is het niet mogelijk celcyclustijden te berekenen.

De meest informatieve van de autoradiografische methoden is de FLM. methode en de dubbele labelling methode. In onderstaande tabellen 2.9.3. (normale epidermis) en 2.9.4. (psoriasis) worden de diverse parameters samengevat.

Tabel 2.9.3.

Auteur	Methode	L.I.	Ts	Tc
Christophers & Schaumlöffel, 1967	DL.	3,3	5,6	142-166
Heenen et al., 1973	DL.	5,8	10,3	184
Steigleder et al., 1973	DL.	2,0	6,6	312
Weinstein et al., 1973	FLM.	3,5	16,0	457
Pullmann et al., 1974	DL.	2,4	6,6	282
Allegra & De Panfilis, 1974	DL.	3,7	7,5	206
Chopra & Flaxman, 1974	FLM.	10,5	11,5	59
Pullmann, 1978	DL.	2,8	7,2	296

Tabel 2.9.3.: Overzicht van door diverse auteurs met behulp van autoradiografische methoden gevonden waarden voor labelling index (L.I.) in procenten, duur van de synthesefase (Ts) en de totale celcyclustijd (Tc) in uren voor normale epidermis. DL.= dubbele labelling methode; FLM.= fraction labelled mitosis curve.

Tabel 2.9.4.

Auteur	Methode	L.I.	Ts	Tc
Weinstein et al., 1968	FLM.	22,7	8,5	37,5
Steigleder et al., 1973	DL.	8,8	14,0	173
Chopra & Flaxman, 1974	FLM.	12,0	6,5	53,5
Goodwin et al., 1974	FLM.	11,0	10,0	91
Duffill et al., 1976	FLM.	10,3	7,7	56
Pullmann, 1978	DL.	10,6	13,6	146

Tabel 2.9.4.: Overzicht van diverse celkinetische parameters voor een psoriasis epidermis bepaald met autoradiografische methoden. L.I.=labelling index in procenten; FLM.= fraction labelled mitosis curve; DL.= dubbele labelling methode; Ts= duur van de S fase in uren; Tc= totale celcyclustijd in uren.

Alle auteurs zijn het erover eens dat de labelling index bij psoriasis is verhoogd, zij het met grote graduele verschillen, vergeleken met normale epidermis. De Ts is volgens Weinstein en Chopra & Flaxman bij psoriasis verkort, volgens Goodwin niet veranderd en volgens Steigleder en Pullmann verlengd t.o.v. normale epidermis. Ook de onderzoeken van Born & Kalkoff (1969) met behulp van het tellen van korrels boven de gemerkte cellen (2.6.7.) wijzen in de richting van een verlengde Ts.

Over een verkorting van de totale celcyclustijd bij psoriasis, zij het ook weer in wisselende mate, zijn alle auteurs het eens.

De groeifractie in vivo van een normale humane epidermis is niet bekend. Bij psoriasis worden in de literatuur uiteenlopende waarden voor de groeifractie opgegeven.

De continue labelling methode, het meten van de intensiteit van de labelling alsmede de scintillatie telling methode zijn ons inziens bij het onderzoek naar de diverse celkinetische parameters van de humane epidermis niet zinvol.

De statische cytometrische methode is op het gebied van het onderzoek naar de celkinetiek van normale en pathologisch veranderde humane epidermis sporadisch toegepast. De in de literatuur vermelde gegevens hebben slechts een voorlopig karakter (Haag et al., 1975; Grove et al., 1976).

De flowcytometrie biedt met het oog op de veel grotere statische betrouwbaarheid, de objectiviteit, de gunstige arbeidsintensiviteit en de snelheid waarmee de gegevens worden verkregen grote perspectieven. Bovendien is de flowcytometrie ons inziens de enige mogelijkheid om therapie-effecten op celkinetisch niveau op de voet te volgen.

2.10. REFERENTIES.

- Abercrombie, M.: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94:239-247, 1946.
- Aherne, W., Camplejohn, R. & Wright, N.: An introduction to cell population kinetics, Edward Arnold Ltd, London, 1977.
- Alavaikko, M.: Selective separation of mouse epidermal cells and cytophotometric evaluation of their nuclear DNA. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 226:9-76, 1971.
- Allegra, F. & De Panfilis, G.: An in vivo method of studying the kinetics of cell proliferation in normal human epidermis. *Acta Dermatovener.*, 54:87-90, 1974.
- Baker, H. & Blair, C.: Cell replacement in the human stratum corneum in old age. *Br. J. Derm.*, 80:367-372, 1968.
- Baker, H. & Kligman, A.: Technique for estimation turnover time of human stratum corneum. *Arch. Dermatol.*, 95:408-411, 1967.
- Baserga, R.: Biochemistry of the cell cycle. *Cell Tissue Kinet.*, 1:167-191, 1968.
- Baserga, R.: The cell cycle and cancer. Dekker, New York, pag. 197, 1971.
- Bauer, F.W. & De Grood, R.M.: Impulse cytophotometry in psoriasis. *Br. J. Derm.*, 93:225-227, 1975.
- Bergstresser, P.R. & Taylor, J.R.: Epidermal "turnover time"- a new examination. *Br. J. Derm.*, 96:503-509, 1977.
- Bertanlanffy, F.D. & Leblond, C.P.: The continuous renewal of the two types of alveolar cells in the lung of the rat. *Anat. Rec.*, 115:515-542, 1953.
- Born, W. & Kalkoff, K.W.: Die gesunde Haut des Psoriatikers in Tritium-thymidine Autoradiogramm. *Arch. klin. exp. Derm.*, 234:125-132, 1969.
- Braun-Falco, O., Christophers, E. & Kurban, A.: Abnormales Verhalten der epidermalen Regeneration bei Patienten mit Psoriasis vulgaris. *Arch. klin. exp. Derm.*, 229:276-284, 1967.
- Brophy, D. & Lobitz, W.: Injury and reinjury to the human epidermis. 2. epidermal basal cell response. *J. Invest. Derm.*, 32:495-502, 1959.
- Brues, A.: The effect of colchicine on regenerating liver. *J. Physiol.*, 86:63, 1936.

- Bucher, O.: Zur Kenntnis der Mitose. 6. Der Einfluss von Colchicin und Tryptaflavin auf den Wachstumsrhythmus und auf die Zellteilung in Fibrozytenkulturen. Z. f. Zellforsch. Mikr. Anat., 29:283-322, 1939.
- Casperson, T.: Die Untersuchungen der Nukleinsäureverteilung im Zellkern. Z. Wiss. Mikr., 53:403-419, 1936.
- Chopra, D.P. & Flaxman, B.A.: Comparative proliferative kinetics of cells from normal human epidermis and benign hyperplasia (psoriasis) in vitro. Cell Tissue Kinet., 7:69-76, 1974.
- Christophers, E. & Schaumlöffel, E.: Zur DNS-Synthesezeit in der menschlichen Epidermis. Arch. klin. exp. Derm., 228:57-64, 1967.
- Clarkson, B.D., Ohkita, T., Ota, K. & Fried, J.: Studies of cellular proliferation in human leukemia I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of H^3 -thymidine. J. Clin. Invest., 46:506-529, 1967.
- Cohn, N. & van Duyn, P.: Constancy of DNA content in adrenal medulla nuclei of cold treated rats. J. Cell Biol., 33:349-354, 1967.
- Cooper, Z.K.: Mitotic rythm in human epidermis; introduction and review of literature. J. Invest. Derm., 2:289-300, 1939.
- Crissman, H.A. & Tobey, R.A.: Cell cycle analysis in 20 minutes. Science, 184:1297-1298, 1974.
- Crissman, H.A., Mullaney, P.F. & Steinkamp, J.A.: Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. In: Methods in Cell Biology, vol. 9, (D.M. Prescott, ed.) Academic Press, New York, pag. 179-246, 1975.
- Dittrich, W. & Göhde, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspension. Z. Naturforsch., 24b:360-361, 1969.
- Duffill, M., Wright, N. & Shuster, S.: The cell proliferation kinetics of psoriasis examined by three in vivo techniques. Br. J. Derm., 94:355-362, 1976.
- Duffill, M., Appleton, D., Dyson, P., Shuster, S. & Wright, N.: The measurement of the cell cycle time in squamous epithelium using the metaphase arrest technique with vincristine. Br. J. Derm., 96:493-502, 1977.
- Dustin, A.: La colchicine réactive de l'imminence caryociné-tique. Arch. Portug. Sc. Biol., 5:38-43, 1936.
- van Duyn, P.: Remarks on the two-wavelengths method. Acta Histochem. Suppl., 6:61-69, 1966.

- Ely, J.O. & Ross, M.H.: Nucleic acids and the Feulgen reaction *Anat. Rec.*, 104:103-123, 1949.
- Epifanova, O.I. & Terskikh, V.V.: On the resting periods in the cell life cycle. *Cell Tissue Kinet.*, 2:75-93, 1969.
- Epstein, W. & Maibach, H.: Cell renewal in human epidermis. *Arch. Dermatol.*, 92:462-468, 1965.
- Filkuka, J., Lederer, B. & Sandritter, W.: Loss of basic nuclear protein during fermentative isolation of epidermal cells. *Acta Histochem. (Jena)*, 29:263-269, 1968.
- Fisher, L.: Determination of normal rate and duration of mitosis in human epidermis. *Br. J. Derm.*, 80:24-28, 1968.
- Fisher, L.: The diurnal mitotic rhythm in the human epidermis. *Br. J. Derm.*, 80:75-80, 1968.
- Fisher, L. & Wells, C.: The mitotic rate and duration in lesions of psoriasis and ichthyosis. *Br. J. Derm.*, 80:235-240, 1968.
- Franke, W.W., Deumling, B. & Zentgraf, H.: Losses of material during cytological preparation of nuclei and chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 80:445-449, 1973.
- Frost, P., Weinstein, G.D. & Van Scott, E.: The ichthyosiforme dermatoses. *J. Invest. Derm.*, 47:561-567, 1966.
- Galant, S.: Initiation of mitosis in relation to the cell division cycle. *Exp. Cell Res.*, 26:395, 1961.
- Gelfant, S.: The cell cycle in psoriasis: a reappraisal. *Br. J. Derm.*, 95:577-590, 1976.
- Gerecke, D.: Zur S-Phasenbestimmung mit markierten Mitosen. *Naturwissenschaften*, 57:360, 1970.
- Gilbert, C.W.: The labelled mitosis curve and the estimation of the parameters of the cell cycle. *Cell Tissue Kinet.*, 5: 53-63, 1972.
- Giovanella, B.C. & Heidelberger, C.: Mouse epidermal cells and carcinogenesis. I. Isolation of skin constituents. *Cancer Res.*, 25:161-181, 1965.
- Goldstein, D.: Aspects of scanning microdensitometry 1. *J. Microsc. (Oxf)*, 92:1-16, 1970.
- Goldstein, D.: Aspects of scanning microdensitometry 2. *J. Microsc. (Oxf)*, 93:15-42, 1971.
- Goodwin, P., Hamilton, S. & Fry, L.: A comparison between DNA synthesis and mitosis in uninvolved and involved psoriatic epidermis. *Br. J. Derm.*, 89:613-618, 1973.

- Goodwin, P., Hamilton, S. & Fry, L.: The cell cycle in psoriasis. *Br. J. Derm.*, 90:517-524, 1974.
- Greulich, R.C.: Aangehaald in : Epstein, W. & Maibach, H.: Cell renewal in human epidermis. *Arch. Dermatol.*, 92:462-468, 1965.
- Grove, G., Anderton, R. & Smith, G.: Cytophotometric studies of epidermal proliferation in psoriatic and normal skin. *J. Invest. Derm.*, 66:236-238, 1976.
- Haag, D., Tschahargane, C. & Ehemann, V.: Isolation of single cell nuclei from human epidermis for cytophotometric DNA-measurements. *Arch. Derm. Res.*, 253:301-310, 1975.
- Halprin, K.M.: Epidermal "turnover time" - A re-examination. *Br. J. Derm.*, 86:14-19, 1972.
- Heenen, M. & Galand, P.: Cell population kinetics in human epidermis: in vitro autoradiographic study by double labeling method. *J. Invest. Derm.*, 56:425-429, 1971.
- Heenen, M., Achten, G. & Galand, P.: Autoradiografic analysis of cell kinetics in human normal epidermis and basal carcinoma. *Cancer Res.*, 33:123-127, 1973.
- Hell, E. & Hodgson, C.: The uptake of H^3 -thymidine by epidermal cells in normal and psoriatic subjects. *Br. J. Derm.*, 78: 262-268, 1966.
- Hilscher, W. & Maurer, W.: Autoradiografische Bestimmung der Dauer der DNS Verdopplung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C^{14} - und H^3 -thymidin. *Naturwissenschaften*, 49:352-354, 1962.
- Hoffman, J.G.: Quantitative analysis of the growth of epidermis. *Arch. Pathol.*, 47:37-43, 1949.
- Howard, A. & Pelc, S.R.: Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relationship to chromosome breakage. *Heredity*, 6 (Suppl.):261-273, 1953.
- Hudson, B., Upholt, W.B., Divinny, J. & Vinograd, J.: The use of an Ethidium Bromide analogue in the dye-buyoant density procedure for the isolation of closed circular DNA: The variation of the superhelix density of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 62:813-820, 1969.
- Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barret, J. & Herzenberg, L.A.: Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166:747-749, 1969.
- Iversen, O.H. & Evensen, A.: Experimental skin carcinogenesis in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 156 (Suppl.): 1-184, pag. 95, 1962.

Impulscytophotometrie. Herausgegeben von M. Andreeff. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1975.

Jansen, L., Hojyo-Tomoko, M. & Kligman, A.: Improved fluorescence staining technique for estimating turnover of the human stratum corneum. Br. J. Derm., 90:9-12, 1974.

Joftes, D.: Radiografy, principles and procedures. J. Nucl. Med., 4:143-154, 1963.

Kaidby, K. & Kurban, A.: Mitotic behaviour of the buccal mucosal epithelium in psoriasis. Br. J. Derm., 85:162-166, 1971.

Kaku, H., Igarashi, Y. & Fujita, S.: Cytokinetic analysis of the human skin in vivo in normal and pathological conditions: a H^3 -thymidine autoradiografic study. Arch. Histol. Jap., 24: 457-470, 1964.

Kamentsky, L.A.: Spectrophotometer: New instrument for ultra-rapid analysis. Science, 150:630-631, 1965.

Kasten, F.H.: Shiff-type reagents in cytochemistry. Histochemie, 1:466-509, 1959.

Katzberg, A.A.: The influence of age on the rate of desquamation of the human epidermis. Am. Assoc. Anatom., 112:418, 1952.

Killmann, S.A., Cronkite, E.P., Robertson, J.S., Flidner, T. M. & Bond, V.P.: Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labelling in human beings in vivo with H^3 -thymidine. Lab. Invest., 12:671-684, 1963.

Kraemer, P.M., Deaven, L.L., Crissman, H.A. & Van Dilla, M.A.: DNA-constancy despite variability of chromosome number. In: E.J. Du Praw, Advances in cell and molecular biology. Academic Press, New York, vol. 2:47-107, 1972.

Leblond, C.P. & Stevens, C.E.: The constant renewal of the epithelium in the albino rat. Ibid., 100:357-378, 1948.

Lennartz, K.: Experimentelle Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Tumorzellen. Verh. dtsch. Ges. Path., 51:340-343, 1967.

Le Pecq, J.B. & Paoletti, C.: A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. J. Mol. Biol., 27:87-106, 1967.

Lipkin, M.: The proliferative cycle of mammalian cells. In: Baserga, The cell cycle and cancer, vol. 1, pag. 1-26, 1971.

Ludford, R.: The action of toxic substances upon the division of normal and malignant cells in vitro and in vivo. Arch. Exp. Zellforsch., 18:411-441, 1936.

- Marks, R.: Epidermal activity in the involved and uninvolved skin of patients with psoriasis. *Br. J. Derm.*, 98:399-404, 1978.
- Mc Minn, R.M.H.: The rate of renewal of intestinal epithelium in the cat. *J. Anat.*, 88:527-532, 1954.
- Mendelsohn, M.: The two-wavelengths method of microspectrophotometry 2. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:415-424, 1958.
- Milstein, H. & Cornell, R.: Diurnal mitotic studies of psoriatic epidermis. *J. Invest. Derm.*, 61:180-182, 1973.
- Mullaney, P.F., Van Dilla, M.A., Coulter, J.R. & Dean, P.N.: Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev. Sci. Instrumen.*, 40:1029-1032, 1969.
- Ornstein, L.: The distributional error in microspectrophotometry. *Lab. Invest.*, 1:250-262, 1952.
- Patau, K.: Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosoma*, 5:341-362, 1952.
- Pinkus, H.: Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. *J. Invest. Derm.*, 19:383-385, 1952.
- Pinkus, H.: Examination of the epidermis by the strip method 2. *J. Invest. Derm.*, 19:431-447, 1952.
- Plewig, G., Fulton, H. & Kligman, A.: Cellular dynamics of comedo formation in acne vulgaris. *Arch. f. dermat. Forsch.*, 242:12-29, 1971.
- Porter, D. & Shuster, S.: A new method for measuring replacement of epidermis and stratum corneum in human skin. *J. Invest. Derm.*, 49:251-255, 1967.
- Potten, C.S.: Epidermal cell production rates. *J. Invest. Derm.*, 65:488-500, 1975.
- Puck, T.T. & Steffen, J.: Life cycle analysis of mammalian cells. *Biophys. J.*, 3:379-397, 1963.
- Pullmann, H.: Autoradiographie-Untersuchung der Zellproliferation bei Psoriasis vulgaris. *Grosse Scripta 3*, Grosse Verlag, Berlin, 1978.
- Pullmann, H., Lennartz, K. & Steigleder, G.K.: In vitro examination of cell proliferation in normal and psoriatic epidermis with special regard to diurnal variations. *Arch. f. dermat. Forsch.*, 250:177-184, 1974.
- Pulse cytometry, part I, Ed. by C.A.M. Haanen, H.F.P. Hilten & J.M.C. Wessels, European Press Medikon, Ghent, 1975.

Pulse cytometry, part II, Ed. by W. Göhde, J. Schumann & Th. Büchner, European Press Medikon, Ghent, 1976.

Pulse cytometry, part III, Ed. by D. Lutz, European Press Medikon, Ghent, 1978.

Pulse cytometry, Flow cytometry 4, proceedings of the 4th international symposium on flow cytometry, Ed. by Laerum, O.D., Lindmo, T. & Thorud, E., Universiteitforlaget Oslo, 1979.

Pulse cytophotometry, Abstracts of the fifth international symposium on flow cytometry. Ed. by Mauro, F. & Mazzini, G., in: Basic and applied histochemistry 24/4, 1980.

Pulse cytophotometry, Abstracts of the 6th international symposium on flow cytometry, Ed. by Wheelless, L., Görttler, K. & Ploem, J.S., 1982.

Quastler, H.: The analysis of cell population kinetics. In: Cell Proliferation, (L.F. Lamerton & R.J.M. Fry, eds) Blackwell, Oxford, 1963.

Quastler, H. & Sherman, F.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res., 17:420-438, 1959.

Rinaldini, L.M.J.: The isolation of living cells from animal tissues. Int. Rev. Cytol., 7:587-647, 1958.

Roenigk, H., Maibach, H. & Weinstein, G.D.: Methotrexate therapy for psoriasis. Guideline revisions. Arch. Dermatol., 108:35, 1973.

Rothberg, S., Crounse, R. & Lee, J.: Glycine-C¹⁴ incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis. J. Invest. Derm., 37: 497-505, 1961.

Rowe, L., Dixon, W.J. & Forsythe, A.: Mitoses in normal and psoriatic epidermis. Br. J. Derm., 98:293-299, 1978.

Scheving, L.E.: Mitotic activity in the human epidermis. Anat. Rec., 135:7, 1959.

Schumann, J., Ehring, F., Göhde, W. & Dittrich, W.: Impuls-cytophotometrie der DNS in Hauttumoren. Arch. klin. exp. Derm., 239:377-389, 1971.

Sprenger, E., Böhm, N. & Sandritter, W.: Durchflussfluoreszenzcytophotometrie für ultraschnelle DNS-Messungen an grossen Zellpopulationen. Histochemie, 26:238-257, 1971.

- Steigleder, G.K., Schumann, H. & Lennartz, K.: Autoradiographic in vitro-examination of psoriatic skin before, during and after dithranol treatment. Arch. f. dermat. Forsch., 246:231-235, 1973.
- Stevens Hooper, C.: Use of colchicine for the measurement of mitotic rate in the intestinal epithelium. Am. J. Anat., 108:231-244, 1961.
- Sutton, R.L.: Early epidermal neoplasia, Arch. Derm. Syph., 37:742-780, 1938.
- Takahashi, M.: Theoretical basis for cell cycle analysis. 1. labelled mitosis wave method. J. Theoret. Biol., 13:202-211, 1966.
- Thuringer, J.M.: Studies on cell division in the human epidermis. Anat. Rec., 40:1-13, 1928.
- Trujillo, T.T. & Van Dilla, M.A.: Adaptation of the fluorescent feulgen reaction to cells in suspension for flow microfluorometry. Acta Cytol., 16:26-30, 1972.
- Van Dilla, M.A., Mullaney, P.F. & Coulter, J.R.: Los Alamos scientific laboratory report LA-3848-Ms, pag.100, National Technical Information Service, US Department of Commerce, Springfield, Virginia, 1967.
- Van Dilla, M.A., Trujillo, T.T., Mullaney, P.F. & Coulter, J.R.: Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. Science, 163:1213-1214, 1969.
- Van Scott, E. & Ekel, T.: Kinetics of hyperplasia in psoriasis. Arch. Dermatol., 88:67-75, 1963.
- Vendrely, C.: Cytophotometry and histochemistry of the cell cycle. In: The cell cycle and cancer, Ed. by R. Baserga, Dekker, New York, 227-268, 1971.
- van Vloten, W.A.: De betekenis van DNA cytofotometrie voor de vroegtijdige diagnostiek van mycosis fungoides. Proefschrift, Leiden, 1974.
- Vulpé, M.: The renewal of the epithelium of the urinary bladder. Thesis, Montreal, 1954.
- Ward, D.C., Reich, E. & Goldberg, I.H.: Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs. Science, 149:1259-1263, 1965.
- Weinstein, G.D.: Autoradiographic studies of turnover time and protein synthesis in pig epidermis. J. Invest. Derm., 44:413-419, 1965.
- Weinstein, G.D.: Biochemical and pathophysiological rationale for methotrexate in psoriasis. Ann. NY Acad. Sci., 186: 452-466, 1971.

Weinstein, G.D. & Frost, P.: Abnormal cell proliferation in psoriasis. J. Invest. Derm.,50:254-259,1968.

Weinstein, G.D. & Frost, P.: Cell proliferation kinetics in benign and malignant skin diseases in humans. Nat. Cancer Inst. Monogr.,30:225-246,1969.

Weinstein, G.D. & Frost, P.: Methotrexate for psoriasis: a new therapeutic schedule. Arch. Dermatol.,103:33-38,1971.

Weinstein G.D. & Mc Cullough, J.L.: Cytokinetics in diseases of epidermal hyperplasia. Ann. Rev. Med.,24:245-252,1973.

Weinstein G.D. & Mc Cullough, J.L.: Cytokinetics and chemotherapy of psoriasis. J. Invest. Derm.,67:26-30,1976.

Weinstein, G.D. & Van Scott, E.: Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. J. Invest. Derm.,45:257-262,1965.

Weinstein, G.D., Roenigk, H.H., Maibach, H.I. & Auerbach, R.: Methotrexate guidelines-update 1981. In: Psoriasis, proceedings of the third international symposium.Ed. by Farber, E.M. & Cox, A.J., pag. 395-396,1981.

Wimble, D. & Quastler, H.: A C^{14} - and H^3 -thymidine double labelling technique in the study of cell proliferation in *Tradescantia* root tips. Exp. Cell Res.,30:8-22,1963.

Wright, N.: Cell population kinetics in human epidermis. Int. J. Derm.,16:449-463,1977.

Würthner, K., Sachs, H. & Bahnsen, J.: Zum Problem der Kernanschnitte bei der Zytophotometrie an histologischen Präparaten. Histochemie,32:261-270,1972.

HOOFDSTUK 3.

FLOWCYTOMETRIE: DE METHODE VAN ONDERZOEK.

- 3.1. Inleiding
- 3.2. Flowcytometer
- 3.3. Afname techniek
- 3.4. Bewerking van het monster
- 3.5. Analyse van de gegevens.
 - 3.5.1. Histogram
 - 3.5.2. Mathematische analyse
 - 3.5.3. Coincidentie
- 3.6. Moeilijkheden bij de interpretatie
 - 3.6.1. Klontjes
 - 3.6.2. Celbeschadiging, onvolledige kleuring en asymmetrie
 - 3.6.3. Correlatie met celcyclus- en turn-overtijd.
- 3.7. Referenties.

FLOWCYTOMETRIE: DE METHODE VAN ONDERZOEK.

3.1. INLEIDING.

In hoofdstuk 2 hebben we een overzicht van diverse methoden ter bestudering van de celkinetiek gegeven. Toepassing van deze methoden bij de bestudering van de kinetiek van normale en psoriasis epidermis brengt aanzienlijke verschillen en tegenstrijdigheden aan het licht.

Flowcytometrie, die sedert kort ook in de dermatologie wordt toegepast, kan op grond van een aantal in hoofdstuk 2 genoemde argumenten de mogelijkheid bieden ons inzicht in de epidermale celgroei te verdiepen.

Dit hoofdstuk geeft een overzicht van de door ons gebruikte apparatuur en preparatiemethode en behandelt een aantal moeilijkheden bij de analyse en de interpretatie van de verkregen gegevens.

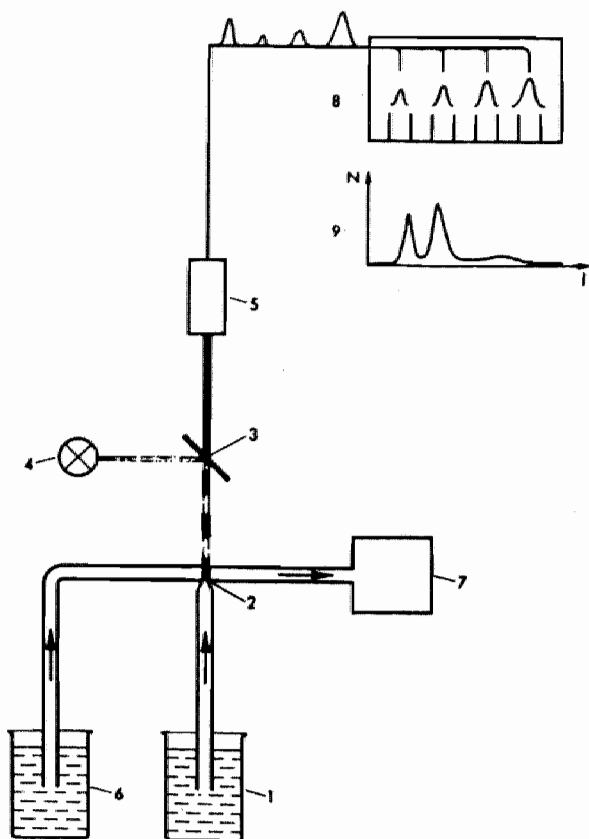
3.2. FLOWCYTOMETER.

De in dit proefschrift gebruikte flowcytometer is de I.C.P. 11 (Phywe, Göttingen, B.R.D.). Onderstaande figuren 3.2.1. en 3.2.2. geven een vereenvoudigde schematische voorstelling van de flowcytometer en de randapparatuur. Alle stappen van het meetproces zijn geautomatiseerd.

De cellen waarvan het DNA kwantitatief aan het fluoro-chroom propidium jodide is gebonden, worden opgezogen via een capillair naar het dieptescherpte veld van een microscoop-cytometer. De belichting van dit veld geschiedt door een hogedruk kwiklamp (HBO 100 W/Osram). Van het emissiespectrum van deze lamp wordt door een aantal filters een zodanig spectrum gekozen dat het fluoro-chroom wordt geëxciteerd. Elke fluoro-chroom bevattende cel zendt, wanneer ze de meetopening passeert, emissielicht uit. Dit fluorescentiesignaal wordt door een photomultiplier omgezet in een elektrisch signaal. De intensiteit van het emissielicht en derhalve ook de grootte van het elektrisch signaal is evenredig met de hoeveelheid fluoro-chroom, derhalve met de hoeveelheid DNA. De elektrische signalen worden versterkt, naar grootte gesorteerd in 128 klassen en opgeslagen in het geheugen van een veelkanaals pulse-hoogte analysator.

Het aantal cellen in elk kanaalnummer wordt uitgelezen en overgebracht naar een rekenmachine (Hewlett-Packard 9810 A calculator plotter control block) door middel van een interface (eigenbouw, afdeling electronica, Med.Fac., K.U.N.). De gegevens kunnen worden gepresenteerd in de vorm van een histogram met behulp van een plotter (Hewlett-Packard 9862).

Figuur 3.2.1.

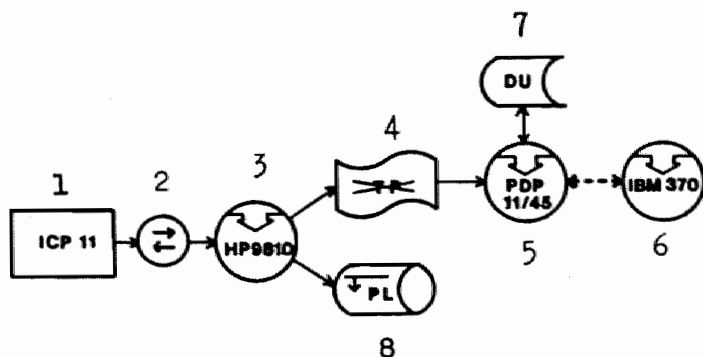


Figuur 3.2.1.: Schematische voorstelling van het optische en electronische gedeelte van de I.C.P. 11 flowcytometer (naar Hillen, 1975).

1. celsuspensie
2. meetveld
3. fluorescentie microscoop
4. hoge druk kwik lamp
5. photomultiplier
6. vloeistof reservoir
7. zuigpomp
8. puls hoogte analysator
9. histogram

A calculator plotter). De analyse van de gegevens vindt plaats door middel van een rekenprogramma (zie 3.5.2.). Via een tape puncher (Hewlett-Packard 9884 A tape punch) bestaat de mogelijkheid tot verdere datamanipulatie door middel van een PDP 11/45 en I.B.M. 370 computer. De optiek van de flowcytometer wordt voor elke meting of serie metingen geijkt. Dit gebeurt door de optiek optimaal in te stellen met behulp van een standaard celsuspensie van kippe-erythrocyten in propidium jodide.

Figuur 3.2.2.



Figuur 3.2.2.: Schematische voorstelling van de flowcytometer en de randapparatuur.

1. I.C.P. 11 flowcytometer
2. interface
3. Hewlett-Packard 9810 A calculator plotter control block
4. Hewlett-Packard 9884 A tape punch
5. PDP 11/45 computer
6. IBM 370 computer
7. magnetische schijven
8. Hewlett-Packard 9862 A calculator plotter

3.3. AFNAME TECHNIJK.

De gebruikte techniek is de door Bauer & De Grood (1976) ontwikkelde methode, waarbij een dunne metaalstrip op de huid wordt gedrukt. De te onderzoeken huid, die opbolt door een gat van 5 mm diameter in het metaal, wordt met een scheermes verwijderd. De biopsie heeft gemiddeld een diameter van 2-3 mm en een dikte van $\pm 0,3$ mm. Bij histologische controle blijken deze biopsieën ruim de gehele epidermis te bevatten. De veroorzaakte excoriaties worden aangestipt met ferrichloride.

3.4. BEWERKING VAN HET MONSTER.

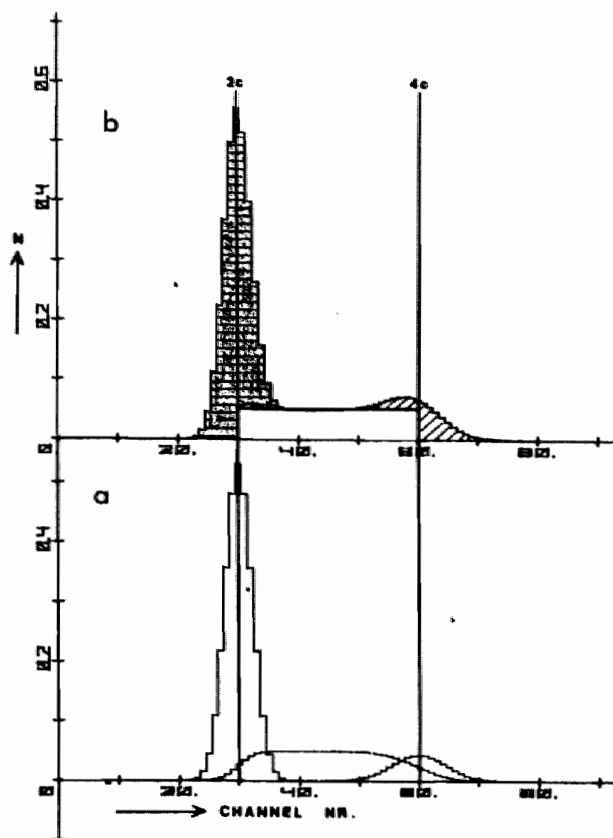
Incubatie van het afgenomen stukje huid vindt plaats gedurende twintig minuten bij 37°C in een $0,15\text{ M}$ fosfaatbuffer ($0,15\text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $0,15\text{ M NaH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}=7,8$), die tevens 1% trypsine (Difco 1:250) en $0,3\%$ dithioerythritol (Sigma D-8255) bevat. Dithioerythritol reduceert de disulfide bruggen tot sulfhydryl groepen en draagt zo bij tot vernietiging of homogenisatie van de desmosomen van de keratinocyten en de basaalmembraan (Kobayasi et al., 1977). Het proteolytische enzym trypsine breekt de desmosomen verder af, terwijl celmembranen, organellen en nucleï intact blijven (Hentzer et al., 1976). De "intacte" monsters worden na incubatie gebracht in enkele druppels propidium jodide ($1\text{ mgr}/100\text{ ml}$) opgelost in bovengenoemde fosfaatbuffer. Door enkele seconden ultrasoon te trillen (70 W , Sonifier B12, Branson sonic power company, Danbury, Connecticut), wordt de epidermis van de dermis gescheiden en worden de epidermiscellen in suspensie gebracht. Het uiteindelijke volume propidium jodide wordt op een zodanig volume gebracht dat de frequentie van de te tellen cellen ± 300 cellen per seconde bedraagt. De celmembraan wordt permeabel gemaakt voor het fluorochroom door twee druppels dimethylsulfoxide (Merck 2951) toe te voegen. Na filtratie door een nylon gaas ($\pm 70\text{ }\mu\text{m}$) wordt een overmaat ribonuclease (4 druppels van een oplossing van $10\text{ mgr/ml aq. dest.}$, Ribonuclease-A, Sigma R 4875, $76\text{ Kunitz units/mgr}$) toegevoegd om eventuele aspecifieke kleuring van RNA te elimineren.

De gehele bovenbeschreven procedure beslaat ± 30 minuten. Het celverlies is minimaal omdat geen centrifugatiestappen nodig zijn (Bauer & De Grood, 1976). Om distributiefouten door onvolledige kleuring te voorkomen wordt een tijdsinterval van minimaal 1 uur aangehouden tussen toevoeging van de propidium jodide en het moment van meting. De suspensie is tenminste 24 uur houdbaar bij 4°C zonder dat dit invloed heeft op de kwaliteit van het histogram of op de kwantiteit van de analyse.

Met trypsine, gecombineerd met dithioerythritol, worden goede celsuspensies, zowel van normale als van abnormale epidermis verkregen, waaruit zonder problemen 2×10^5 cellen kunnen worden geteld.

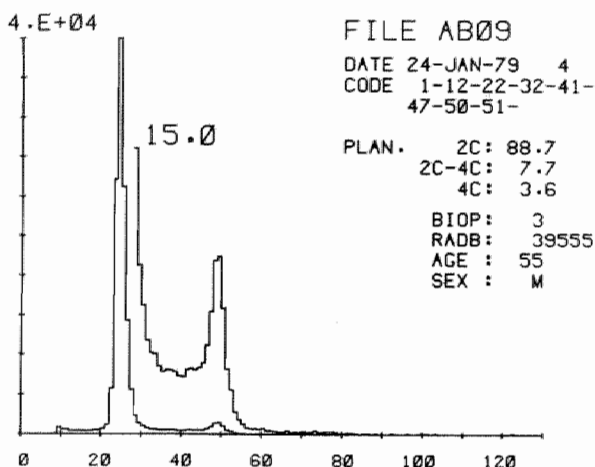
Incubatie met pepsine is overwogen; ook hiermee wordt een goede dissociatie van de epidermiscellen verkregen. Op grond

Figuur 3.5.1.1.



Figuur 3.5.1.1.: Figuur a geeft de verdelingen van de 2c, 2c-4c en 4c cellen weer. Figuur b geeft de samengestelde verdeling weer. Het G_2M maximum is naar links verschoven. Het percentage 2c cellen wordt verkregen uit integratie van het gearceerde gebied. Het percentage G_2M uit integratie van het gestreepte gebied. De rechthoek tussen het 2c-maximum en het dubbele van het 2c-maximum en de hoogte van het plateau tussen de 2c en 4c piek vormt het percentage S cellen.

Figuur 3.5.1.2.



Figuur 3.5.1.2.: Representatief DNA histogram van normale humane epidermis. Totale aantal gemeten cellen: 128.956.

van de histogrammen is voor deze methode niet gekozen omdat klontjesvorming optreedt. Ook worden de cellen in de mitose-fase door het pepsine beschadigd (Beck, 1977). Hierdoor wordt de grootte van de 4c fractie beïnvloed. Bij de infiltratie blijft het stratum corneum als een dun vlies en de dermis als een weefselflard in het filter achter. Histologische controle van de dermis toont aan dat er geen epidermiscellen meer aan vast zitten. Ook aan het stratum corneum hechten geen epidermiscellen meer.

1.5. ANALYSE VAN DE GEGEVENS.

1.5.1. HISTOGRAM.

Het histogram wordt verkregen door het aantal cellen uit te zetten als functie van de 128 DNA klassen.

Het DNA gehalte van normale humane diploïde cellen is constant (Vendrely, 1971; Kraemer et al., 1972). In theorie komen derhalve alle cellen in een homogene populatie met 2c DNA in één kanaalnummer. Op grond van een aantal fouten (preparatieve, kleuring, optische en elektronische fouten) treedt er een meer of minder brede verdeling rond het gemiddelde op, uitgedrukt in de variatiecoëfficiënt (c.v.). Deze coëfficiënt ligt in onze experimenten rond de 5-7%. De variatiecoëfficiënt is bij de flowcytometrische methode veel kleiner dan die bij de statische cytometrie (Kraemer et al., 1972; Göhde, 1973).

Door het voltage van de photomultiplier te veranderen kan de 2c piek in een willekeurig kanaalnummer worden geplaatst. Cellen met de dubbele hoeveelheid DNA komen in het dubbele kanaalnummer. Cellen met DNA hoeveelheden tussen 2c en 4c komen in het tussenliggende gebied. Omdat de verdeling van de 2c cellen het begin van de verdeling van de S fase cellen en de verdeling van de cellen in de 4c piek het einde van de verdeling van de S fase cellen overlapt, schuiven de 2c en 4c piek naar elkaar toe, afhankelijk van de grootte van de diverse fracties. (figuur 3.5.1.1.).

Figuur 3.5.1.2. geeft een representatief voorbeeld van een histogram.

3.5.2. MATHEMATISCHE ANALYSE.

Het percentage cellen in de verschillende fasen van de celcyclus kan worden berekend met behulp van diverse mathematische methoden (Dean & Jett, 1974; Baisch & Linden, 1975; Baisch et al., 1975). De hier gebruikte analyse is een modificatie van de oorspronkelijk door Göhde (1973) voorgestelde planimetriscie methode. Deze methode is gebaseerd op de veronderstelling dat de verdelingen volgens Gauss zijn en dat de snelheid van synthese door de S fase lineair is. In dat geval wordt de vorm van de curve van de cellen in de S fase benaderd door een rechthoek tussen het 2c-maximum en het dubbele van het 2c-maximum. De hoogte van

de rechthoek wordt gevormd door het plateau tussen 2c en 4c in het histogram. Uit figuur 3.5.1.1. blijkt dat deze hoogte de hoogte van het S fase plateau benadert. Het percentage 2c cellen wordt verkregen door het gestippelde oppervlak van het histogram te integreren. Het percentage 4c cellen wordt verkregen door integratie van het gestreepte gebied.

Het verschil met het Göhde-model is dat in zijn model de rechthoek wordt getrokken door de 2c en 4c maxima. Het grote voordeel van de planimetrische methode is de eenvoud. De verkregen resultaten met het Göhde-model stemmen, mits aan een aantal voorwaarden wordt voldaan, overeen met de percentages verkregen met complexe computerprogramma's (Baisch et al., 1975).

Een van deze voorwaarden is een niet te grote variatiecoëfficiënt. De onderstaande tabel 3.5.2.1. geeft de gemeten percentages weer bij de diverse variatiecoëfficiënten. Bij een coëfficiënt van 10% wijken de percentages niet meer dan $\pm 5\%$ af. De plotter control block is bij onze experimenten zo geprogrammeerd dat bij een c.v. van meer dan 10% de diverse fracties niet meer worden berekend. De invloed van het percentage van de S fase cellen op de diverse metingen is ook uit tabel 3.5.2.1. af te leiden. Hierbij blijken de percentages S in de orde van grootte waarin het percentage S in de epidermis varieert, geen wezenlijke afwijking van het theoretische percentage te geven. De met ons gemodificeerd model verkregen resultaten stemmen beter overeen met de theoretische waarden dan die met het door Göhde voorgestelde model. Onze apparatuur geeft de percentages in 1 cijfer achter de komma aan.

3.5.3. COINCIDENTIE.

Het probleem van de coïncidentie is voor het eerst beschreven door Göhde et al. (1976). Alle te meten cellen bevinden zich in een waterige oplossing en passeren het meetveld met een in meerdere of mindere mate constante snelheid. Indien de ruimte tussen de partikels groot genoeg is worden zij geregistreerd als aparte signalen. Wanneer twee partikels zo snel na elkaar komen dat de signalen elkaar overlappen kan de photomultiplier deze niet meer scheiden in twee aparte signalen, maar wordt één groter signaal geregistreerd. Dit signaal zal een waarde tussen 2c en 4c hebben. Door coïncidentie worden derhalve ten onrechte signalen in het "S" gebied geplaatst. In het extreme geval dat de twee signalen geheel samenvallen wordt het geregistreerde signaal in de 4c piek geplaatst.

De mate van coïncidentie is afhankelijk van de pulse rate en de breedte van het signaal. Directe meting van deze twee parameters zou het mogelijk maken een correctiefactor in

Tabēl 3.5.2.1.

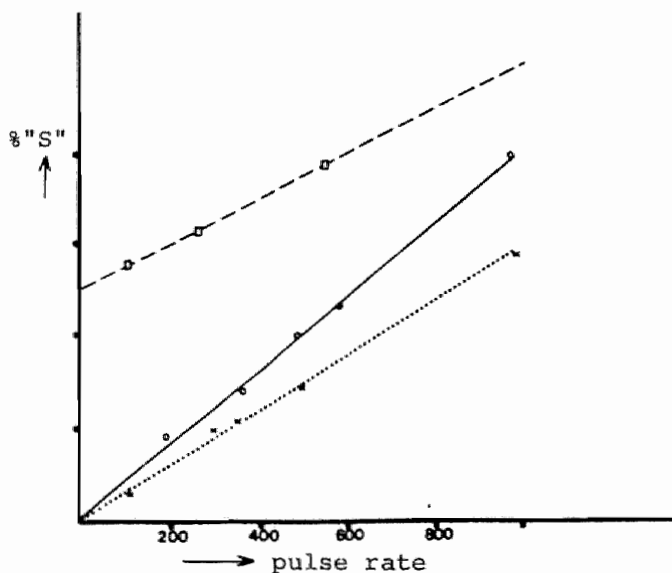
THEORETISCHE WAARDE				GEVONDEN WAARDE "BOEZEMAN-DE JONGH"		
C.V.	G ₁	S	G ₂ M	G ₁	S	G ₂ M
= 0.05	95	4	1	95.011	4.010	0.979
= 0.075	95	4	1	95.023	4.023	0.954
= 0.10	95	4	1	95.024	4.084	0.892
=====						
= 0.05	85	10	5	85.026	10.025	4.949
= 0.075	85	10	5	85.054	10.066	4.880
= 0.10	85	10	5	85.027	10.300	4.673
=====						
= 0.05	80	15	5	80.039	15.037	4.924
= 0.075	80	15	5	80.083	15.094	4.823
= 0.10	80	15	5	80.092	15.320	4.588
=====						
= 0.05	75	20	5	75.051	20.050	4.899
= 0.10	75	20	5	75.148	20.357	4.494
=====						
= 0.05	80	10	10	80.026	10.025	9.949
= 0.10	80	10	10	79.990	10.410	9.599
=====						
= 0.05	70	20	10	70.051	20.050	9.899
= 0.10	70	20	10	70.106	20.480	9.414
=====						
= 0.05	70	10	20	70.034	10.000	19.968
= 0.10	70	10	20	69.921	10.620	19.459
=====						
= 0.05	60	20	20	60.051	20.050	19.899
= 0.10	60	20	20	60.036	20.690	19.273
=====						

Tabel 3.5.2.1.: Overzicht van de met het door Boezeman & De Jong gemodificeerde planimetrische model gevonden percentages voor de diverse fracties bij de diverse variatiecoëfficiënten (c.v.) en de diverse theoretische waarden voor de fracties van de celcyclus.

te voeren. Omdat de I.C.P. 11 apparatuur geen mogelijkheid biedt de signaalbreedte te meten moet voor de coïncidentie worden gecorrigeerd met behulp van calibratie curven. Voor het maken van deze calibratiecurven is het effect van de pulse rate op het percentage kippe-erythrocyten, dat wordt geregistreerd met een DNA waarde tussen 2c en 4c, nagegaan. Kippe-erythrocyten behoren in het perifere bloed niet meer te delen en moeten derhalve alle eenzelfde 2c hoeveelheid DNA hebben. Desalniettemin stijgt het aantal signalen, dat geregistreerd wordt met een DNA hoeveelheid tussen 2c en 4c, lineair van 0,3% bij 100 cellen per seconde tot 3% bij een pulse rate van 1000 cellen per seconde. Op analoge wijze is ook het effect van de pulse rate op het "percentage S" nagegaan voor humane epidermiscellen en perifere leukocyten.

In figuur 3.5.3.1. worden de verschillende curves weergegeven. Het snijpunt met de Y as is het werkelijke percentage cellen met 2c-4c DNA waarden. De helling van de verkregen curve varieert een weinig van ijking tot ijking, afhankelijk van verschillen in het flowsysteem hetgeen resulteert in veranderingen in signaalbreedte.

Figuur 3.5.3.1.



Figuur 3.5.3.1.: Het effect van de pulse rate (cellen per seconde) op het percentage geregistreeerde signalen met een DNA hoeveelheid tussen 2c en 4c (%S). x.....x = kippe-erythrocyten; O—O = perifere leukocyten; ----- = humane epidermiscellen.

Calibratie curven voor humane epidermismonsters kunnen niet routinematig worden gemaakt omdat hiervoor aanzienlijke hoeveelheden materiaal nodig zijn. Derhalve geven we de voorkeur aan een correctiefactor die is afgeleid van de calibratie curve van kippe-erythrocyten of perifere leukocyten. De in dit proefschrift gebruikte correctiefactor bedraagt 0,3% voor de S fractie en 0,12% voor de G₂M fractie per pulse rate van 100 cellen per seconde. De gecorrigeerde percentages worden derhalve aldus berekend:

$$\text{gecorrigeerd \% S} = \text{gemeten \% S} \text{ minus } 0,3\% \times \frac{\text{pulse_rate}}{100}$$

$$\text{gecorrigeerd \% G}_2\text{M} = \text{gemeten \% G}_2\text{M} \text{ minus } 0,12\% \times \frac{\text{pulse_rate}}{100}$$

De relatieve fout in de gemeten waarden voor de S fractie voor normale epidermis kan zeer aanzienlijk zijn (tot $\pm 100\%$). Derhalve kunnen de waarden voor celcyclustijd en turnovertijd, die gebaseerd zijn op de ongecorrigeerde waarden voor het percentage S, aanmerkelijk te laag worden geschat. Voor psoriasiscellen met hun veel hoger percentage S en G₂M is de relatieve fout veel kleiner.

6. MOEILIKHEDEN BIJ DE INTERPRETATIE.

6.1. KLONTJES.

Met de flowcytometer kan geen onderscheid worden gemaakt tussen één cel met 4c DNA en een klontje van twee cellen, elk met 2c DNA. Analooq is er geen verschil tussen octoploide cellen en een klontje van vier diploide cellen. Om het percentage 4c cellen niet te hoog te schatten is het noodzakelijk bij het prepareren van het monster zoveel mogelijk losse cellen te verkrijgen. In de histogrammen van suspensies van kippe-erythrocyten, bereid volgens de normale procedure, die voor elke serie metingen zijn gemaakt ter optimale instelling van de apparatuur, zijn pieken bij 4c, 6c en 8c waarneembaar. In het perifere bloed delen de erythrocyten niet meer. De pieken bij 4c, 6c en 8c representeren derhalve klontjes van twee, resp. drie, resp. vier cellen. Na ultrasone trilling (80 W, 10 sec.) is de klontjesvorming steeds sterk afgenomen. Onder bepaalde preparatieve omstandigheden komen ook in suspensies van epidermiscellen klontjes voor. Dit betekent dat de 4c piek bestaat uit cellen met 4c DNA (echte G₂M cellen) en klontjes van twee diploide cellen. Wanneer echter klontjes van twee voorkomen, zullen ook in een bepaalde verhouding klontjes van drie en vier cellen voorkomen. De bijdrage door klontjes aan de 4c piek kan worden bepaald uit de verhouding van de 4c, 6c en 8c pieken voor en na ultrasoon trillen (Bauer, persoonlijke mededeling). Met deze correctie-

factor kan het percentage cellen in de G_2M fractie zonodig worden gecorrigeerd. In het algemeen is het voorkomen van klontjes in de histogrammen te verwaarlozen wanneer de epidermiscelsuspensies op bovenbeschreven wijze zijn bereid.

3.6.2. CELBESCHADIGING, ONVOLLEDIGE KLEURING EN ASYMMETRIE.

Wanneer de cellen en nuclei kapot gaan zullen er brokstukken ontstaan met een DNA waarde kleiner dan 2c. Dit uit zich in een voorpiek of in een asymmetrische linker schouder van de 2c piek. Ook klontjes fluorochoorm of verontreinigde partikels komen hier terecht. Met onze standaard preparatieve methode hebben we bij normale epidermiscellen nauwelijks last van afbraak. Bij epidermiscellen uit een psoriasislaesie is dit in het algemeen in geringe mate het geval. Bij de analyse wordt de voorpiek geheel geëlimineerd. Een asymmetrische schouder is echter een foutenbron, omdat de analyse is gebaseerd op de veronderstelling dat de verdelingen verdelingen volgens Gauss zijn. Extreme afbraak in de vorm van een asymmetrische linker flank betekent dat het histogram met de door ons gebruikte rekenmethode niet kan worden geanalyseerd. Bij deze histogrammen zijn dan ook de diverse fracties niet berekend.

Onvolledige kleuring uit zich bij onze standaard methode in een asymmetrische rechter schouder van de 2c piek. Dit probleem wordt vrijwel geheel uitgeschakeld door een tijdsinterval van 1 uur tussen toevoeging van het fluorochoorm en het moment van meting aan te houden.

Asymmetrie van de rechter schouder van de 2c piek kan ook worden veroorzaakt door een niet-lineaire progressie van de cellen door de S fase of door synchronisatie van een gedeelte van de proliferatieve cellen. Ook in dit geval kunnen de percentages van de diverse fracties niet op standaard manier worden berekend.

3.6.3. CORRELATIE MET CELCYCLUS- EN TURNOVERTIJD.

Met de hier gebruikte procedure worden alle levende epidermiscellen in oplossing gebracht. De celsuspensie bestaat derhalve uit de proliferatieve celpopulatie en de gedifferentieerde cellen. De gedifferentieerde cellen hebben een 2c DNA waarde, evenals de G_1 cellen, en worden door de flowcytometer derhalve niet gescheiden op grond van hun DNA gehalte. De percentages S en G_2M hebben dus betrekking op de gehele celpopulatie. Wil men de gemeten percentages S en G_2M relateren aan de proliferatieve cellen, dan moet men het aandeel van de proliferatieve cellen in de totale populatie kennen. In de literatuur wordt voor de normale huid vermeld dat dit aandeel $\pm 30\%$ bedraagt (Halprin, 1972). Voor psoriasis is deze waarde niet met zekerheid bekend. Uit de histologie van psoriasis kan men afleiden dat het aandeel van de proliferatieve cellen in een vol ontwikkelde laesie beduidend groter moet zijn. Weinstein & Housman (1972) veronderstellen dat in een psoriasislaesie het aantal prolifererende cellen

even groot is als het aantal gedifferentieerde cellen. Bij de flowcytometrie wordt de hoeveelheid DNA van de cellen en niet, zoals bij autoradiografie, de DNA synthese gemeten. Naar alle waarschijnlijkheid echter zal een cel met een DNA hoeveelheid tussen 2c en 4c een cel zijn die DNA synthetiseert.

Uitgaande van deze feiten geldt, wanneer men kijkt naar het aantal cellen met DNA waarden tussen 2c en 4c (%S), dat:

$$\% S = \frac{N_s}{N_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

Gerelateerd aan de cellen in de celcyclus,

$$\% S' = \frac{N_s}{N_{cycl}} \times 100 \quad (2)$$

Uit (1) en (2) volgt:

$$\% S' = \frac{N_{tot}}{N_{cycl}} \times \% S \quad (3)$$

In deze formule staat N_{cycl} / N_{tot} voor de groeifractie. Deze groeifractie is hier gedefiniëerd als dat deel van het totale aantal kernhoudende cellen, dat de celcyclus daadwerkelijk doorloopt en niet als het deel van de basale cellen dat proliferereert.

De relatie tussen de turnovertijd van de levende epidermis (de tijd die nodig is voor het produceren van een aantal cellen gelijk aan de grootte van het compartiment) en de celcyclustijd is:

$$T_{turn ep} = \frac{N_{tot}}{N_{cycl}} \times T_c \quad (4)$$

of $T_c = \text{groeifractie} \times T_{turn ep}$

echter,
$$\frac{T_c}{T_s} = \frac{N_{cycl}}{N_s} \quad (5)$$

Substitutie van (5) en (1) in (4) geeft:

$$T_{\text{turn ep}} = -\frac{T_s}{\%S} \times 100 \quad (6)$$

In plaats van uit te gaan van de eenvoudige formule

$$-\frac{T_s}{T_c} = -\frac{N_s}{N_{\text{cycl}}} \text{ van Weinstein \& Frost (1968) kunnen ook de}$$

meer ingewikkelde formules van Duffill et al. (1976) worden gebruikt. De gedachtengang verandert hierdoor echter niet wezenlijk.

Wanneer de T_s bekend is kan de turnovertijd van de levende epidermis berekend worden uit het $\% S$ van het DNA histogram. Deze afleidingen gelden echter alleen als er sprake is van een "steady state" conditie en als de cellen at random zijn verdeeld over de celcyclus. Het is duidelijk dat deze vergelijkingen met terughoudendheid moeten worden geïnterpreteerd.

De in bovenbeschreven afleidingen gebruikte symbolen worden als volgt gedefinieerd:

- N_{tot} = aantal cellen in de levende epidermis;
- N_s = aantal cellen met een DNA hoeveelheid tussen 2c en 4c DNA;
- N_{cycl} = aantal cellen dat de celcyclus daadwerkelijk doorloopt;
- $\% S$ = cellen met DNA waarden tussen 2c en 4c, uitgedrukt als percentage van het totale aantal cellen, zoals met de flowcytometer wordt gemeten;
- $\% S'$ = cellen met DNA waarden tussen 2c en 4c, uitgedrukt als percentage van de werkelijk prolifererende populatie;
- T_s = duur van de S fase;
- T_c = celcyclustijd;
- $T_{\text{turn ep}}$ = turnovertijd van de levende epidermis;
- G.F. = groeifractie.

3.7. REFERENTIES.

Baisch, H. & Linden, W.A. : Different mathematical models for pulse-cytophotometric evaluations applied to asynchronous and partially synchronized cell populations. In: Pulse-cytophotometry I, C.A.M. Haanen, H.F.P. Hillen & J.M.C. Wessels, European Press Medikon, Ghent, pag. 61-67, 1975.

Baisch, H., Göhde, W. & Linden, W.A.: Mathematical analysis of ICP-data to determine the fraction of cells in the various phases of the cell cycle. In: Pulse-cytophotometry I, C.A.M. Haanen, H.F.P. Hillen & J.M.C. Wessels, European Press Medikon, Ghent, pag. 68-76, 1975.

Bauer, F.W. & De Grood, R.M.: Improved technique for epidermal cell cycle analysis. Br. J. Derm., 95:565-567, 1976.

Beck, H.P.: Effect of pepsin pretreatment on pulse-cytophotometric DNA histograms. Cell Tissue Kinet., 10:265-268, 1977.

Dean, P.N. & Jett, J.H.: Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. J. Cell. Biol., 60:523-530, 1974.

Duffill, M., Wright, N. & Shuster, S.: The cell proliferation kinetics of psoriasis examined by three in vivo techniques. Br. J. Derm., 94:355-362, 1976.

Göhde, W.: Zellzyklusanalysen mit dem Impulscytophotometer. Der Einfluss chemischer und physikalischer Noxen auf die Proliferationskinetik von Tumorzellen. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Münster, 1973.

Göhde, W., Schumann, J. & Früh, J.: Coincidence eliminating device for pulse-cytophotometry. In: Pulse-cytophotometry part II, W. Göhde, J. Schumann & Th. Büchner, European Press, Medikon, Ghent, pag. 79-85, 1976.

Halprin, K.M.: Epidermal "turnover time" - A re-examination Br. J. Derm., 86:14-19, 1972.

Hentzer, B. & Kobayasi, T.: Dissociation of human adult epidermal cells by disulfide-reducing agents and subsequent trypsinization. Acta Dermatovener. (Stockholm) 56:19-25, 1976.

Hillen, H.F.P.: Pulse cytophotometry in acute leukemia. Proefschrift, Nijmegen, 1975.

Kobayasi, T., Hentzer, B. & Asboe-Hansen, G.: Degradation of dermal fibrillar structures: effects of collagenase, elastase, dithioerythrol and citrate. Acta Dermatovener. (Stockholm), 57:379-387, 1977.

Kraemer, P.M., Deaven, L.L., Crissman, H.A. & Van Dilla, M.A.: DNA-constancy despite variability of chromosome number. In: E.J. Du Praw, Advances in Cell and Molecular Biology, Academic Press, New York, vol. 2, pag. 47-107, 1972.

Vendrelly, C.: Cytophotometry and histochemistry of the cell cycle. In: R. Baserga, The cell cycle and cancer, Dekker, New York, pag. 227-268, 1971.

Weinstein, G.D. & Frost, P.: Abnormal cell proliferation in psoriasis. J. Invest. Derm., 50:254-259, 1968.

Weinstein, G.D. & Housman, R.: Interrelationship of epidermal proliferative and differentiated cell kinetics. J. Invest. Derm., 58:265-272, 1972.

DNA DISTRIBUTIE IN NORMALE HUMANE EPIDERMIS.

- 4.1. Inleiding
- 4.2. Materiaal en methode
- 4.3. Resultaten
 - 4.3.1. Normaal waarden
 - 4.3.2. Invloed van het geslacht
 - 4.3.3. Invloed van de leeftijd
 - 4.3.4. Invloed van het seizoen
 - 4.3.5. Invloed van de plaats op het lichaam
- 4.4. Discussie
- 4.5. Referenties

DNA DISTRIBUTIE IN NORMALE HUMANE EPIDERMIS.

4.1. INLEIDING.

Voor de invoering van de flowcytometrie werd het onderzoek naar de spreiding van de diverse celkinetische parameters en de daaruit berekende celcyclustijden van de normale epidermis bemoeilijkt door de arbeidsintensiviteit van de te verrichten onderzoeken. Ook de statistische betrouwbaarheid liet, gezien het vaak kleine aantal onderzochte cellen en patiënten, te wensen over. Vergelijking van de in de literatuur vermelde gegevens brengt dan ook aanzienlijke tegenstellingen aan het licht. Flowcytometrie van een met propidium jodide gekleurde epidermiscelsuspensie maakt het mogelijk informatie over de verdeling van het DNA gehalte van grote aantallen individuele cellen te verkrijgen binnen korte tijd.

Bovendien geeft het meten van een groot aantal (10^5) cellen een statistische betrouwbaarheid die met geen van de andere beschikbare methoden is te bereiken. Omdat het afnemen van de huidmonsters gemakkelijk en onschuldig is, kunnen vele biopsieën worden verkregen.

De percentages cellen in de diverse fasen van de celcyclus kunnen uit de histogrammen worden berekend, omdat cellen in de G_1 , S en G_2M -fase worden gekenmerkt door een karakteristieke hoeveelheid DNA.

Het doel van dit hoofdstuk is statistisch meer betrouwbare informatie over de DNA verdelingen van de cellen van de normale humane epidermis te verkrijgen.

De invloed van het geslacht en de leeftijd op deze parameters wordt onderzocht. Eventuele verschillen in DNA distributie tussen zomer en winter zijn bekeken. De verschillen tussen diverse plaatsen op het lichaam zijn onderzocht teneinde na te gaan of bij de beoordeling van een histogram van cellen afkomstig uit een psoriasislaesie rekening moet worden gehouden met de plaats van afname. Uit de met de flowcytometer verkregen gegevens is de turnovertijd van het gehele levende epitheel en de celcyclustijd van de basale cellen berekend. De gevonden resultaten zijn met de in de literatuur opgegeven waarden vergeleken.

4.2. MATERIAAL EN METHODE.

De huidbiopsieën zijn genomen van normaal uitziende huid van vrijwilligers zonder huidziekten. Bij allen was de familie-anamnese negatief voor psoriasis. De monsters zijn genomen

van de rug, armen, benen en knieën. Afname en bewerking van de monsters geschiedde als beschreven in 3.3. en 3.4.. Het tijdstip van afname was tussen 9.00-10.00 uur a.m. teneinde beïnvloeding door een mogelijke "diurnal variation" uit te sluiten. De fluorescentie van het aan propidium jodide gebonden DNA is gemeten met behulp van de Impuls Cytophotometer (I.C.P. 11, Phywe, Göttingen, BRD) (cf. 3.2.). Analyse van de histogrammen vond plaats met behulp van een programma ontwikkeld door De Jongh & Boezeman (cf. 3.5.) dat een modificatie is van het door Baisch & Linden (1975) beschreven planimetrische model. Waar aangegeven zijn de waarden gecorrigeerd voor de coincidentie (cf. 3.5.3.). De statistische analyse geschiedde met Statistical Package for the Social Sciences (S.P.S.S.) subprogramma's (Nie, 1975; U.R.C., 1979).

4.3. RESULTATEN.

4.3.1. NORMAAL WAARDEN.

De gemiddelde percentages diploide, tetraploide en interploide cellen, alsmede de ratio S/G_2M , voor normale humane epidermis zijn weergegeven in tabel 4.1.

Tabel 4.1.

	Normale epidermis n = 137.			
	2c	S	G_2M	S/G_2M
A	96,2 ± 1,0	2,6 ± 0,8	1,2 ± 0,5	2,5 ± 1,1
B	97,4	1,8	0,9	-

Tabel 4.1.: Analyse van de DNA verdelingen in de normale humane epidermis bij 137 huidmonsters. A: gebaseerd op de planimetrische methode. B: gecorrigeerd voor de coincidentie (gemiddelde pulse rate 250 cellen per seconde).

4.3.2. INVLOED VAN HET GESLACHT.

Tussen mannen en vrouwen bestaan geen significante verschillen in DNA distributie in normale epidermiscellen (tabel 4.2.).

Tabel 4.2.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Man	99	96,3	2,6	1,2	2,5
Vrouw	38	96,1	2,6	1,3	2,4
Signific.	p=	47%	99%	16%	40%

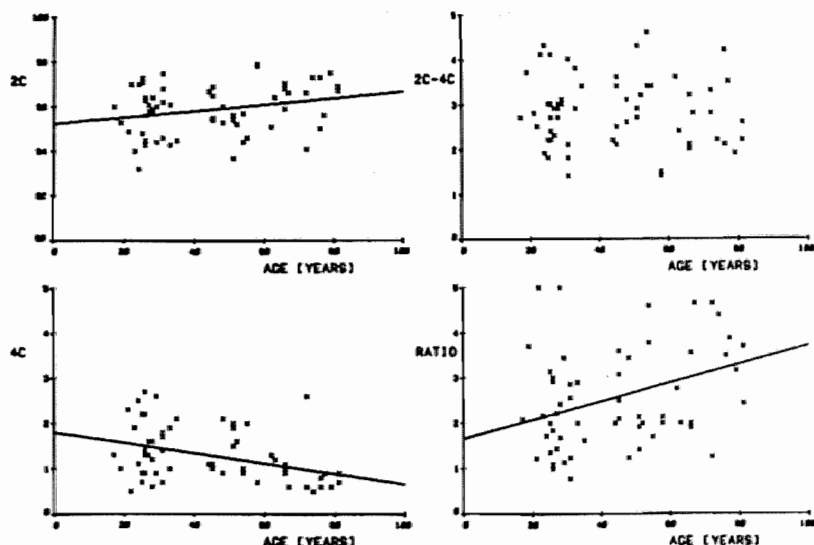
Tabel 4.2.: Invloed van het geslacht van de persoon op de DNA verdelingen in de normale humane epidermis.

4.3.3. INVLOED VAN DE LEEFTIJD.

Teneinde de invloed van het jaargetijde (zie 4.3.4.) uit te sluiten zijn alleen metingen die in juni-juli zijn verricht geselecteerd voor de analyse. Er is tevens zorg voor gedragen dat in de leeftijdsgroepen een uniforme verdeling wat betreft de plaats van afname bestaat.

Figuur 4.1. toont de met behulp van de PDP 11/45 computer verkregen scatter diagrammen met daarin getrokken de regressielijnen van de 4 onderzochte parameters tegen de leeftijd.

Figuur 4.1.



Figuur 4.1.: De met behulp van de PDP 11/45 computer verkregen scatter diagrammen en de regressielijnen van de diverse parameters tegen de leeftijd.

Tabel 4.3. geeft de invloed van de leeftijd van de persoon weer op de gemeten percentages. De percentages 2c en G_2M zijn afhankelijk van de leeftijd. Bij het ouder worden neemt de 2c fractie met 0,014% per jaar toe. Het percentage G_2M daalt met 0,011% per jaar. Het percentage S is onafhankelijk van de leeftijd. Ook de ratio S/G_2M verandert significant bij het ouder worden. Per jaar stijgt deze ratio met 0,02%.

Tabel 4.3.

	Toename per jaar	snijpunt met Y-as	signifi- cantie
2c	0,014	95,2	p= 3,0%
S	-	2,9	p= 30,0%
G_2M	-0,011	1,8	p= 0,2%
S/G_2M	0,02	1,7	p= 0,3%

Tabel 4.3.: De invloed van de leeftijd op de DNA verdelingen in de normale epidermis. De veranderingen in procenten per jaar veroudering voor de diverse fracties. Snijpunt met de Y-as is leeftijd = 0 jaar.

4.3.4. INVLOED VAN HET "SEIZOEN".

De diverse percentages cellen in de verschillende fasen van de celcyclus van huidmonsters genomen in juni-juli versus november-december zijn weergegeven in tabel 4.4. Bij de analyse is zorg gedragen voor een uniforme verdeling wat betreft de leeftijdsverdeling en de plaats van afname. De waarden voor 2c, S en G_2M verschillen significant ($p \leq 5\%$). De ratio S/G_2M verandert niet met het "seizoen".

Tabel 4.4.

	juni-juli	november- december	signifi- cantie
2c	95,9	96,5	0,1%
S	2,8	2,4	0,1%
G_2M	1,3	1,1	3 %
S/G_2M	2,6	2,4	40 %
	N = 60	N = 77	

Tabel 4.4: De gemeten DNA verdelingen in celsuspensies van normale epidermis afgenomen in juni-juli en in november-december.

4.3.5. INVLOED VAN DE PLAATS OP HET LICHAAM.

Onderstaande tabel 4.5. geeft de DNA verdelingen weer voor de normale epidermis op verschillende plaatsen op het lichaam. Ook hier zijn, teneinde "seizoensinvloeden" uit te sluiten alleen metingen die in de periode juni-juli zijn verricht gebruikt voor de analyse. De verkregen waarden zijn gevonden na lineaire correctie voor leeftijdsinvloeden.

Tabel 4.5.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Arm	15	95,2 ± 1,1	3,1 ± 0,7	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,5
Been	12	96,2 ± 1,2	2,7 ± 0,7	1,1 ± 0,6	2,9 ± 1,2
Rug	8	95,7 ± 0,6	3,0 ± 0,5	1,3 ± 0,4	2,6 ± 1,0
Knie	13	95,7 ± 1,1	2,9 ± 1,0	1,4 ± 0,6	2,4 ± 1,1
Significantie op 5% grens					
		+	-	+	+

Tabel 4.5.: Overzicht van de DNA verdelingen in de normale epidermiscellen op verschillende plaatsen op het lichaam en de significantie op de 5% grens.

Tabel 4.6. toont aan dat de verschillen in plaats voornamelijk worden veroorzaakt door verschillen tussen arm en been.

Tabel 4.6.

	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Arm-been	+	-	+	+
Arm-rug	-	-	+	+
Arm-knie	-	-	-	-
Been-rug	-	-	-	-
Been-knie	-	-	-	-
Rug-knie	-	-	-	-

Tabel 4.6.: Overzicht van de significantie (p < 5%) van de verschillen tussen enkele plaatsen op het lichaam voor de fracties van de celcyclus en voor de ratio S/G₂M. - = significantie meer dan 5%; + = significantie minder dan 5%.

4.4. DISCUSSIE.

Gegevens over cytofotometrische onderzoeken van normale en pathologisch veranderde humane epidermis zijn zeldzaam in de literatuur. Grove et al. (1976) voerden statische cytofotometrische onderzoeken uit bij normale en psoriasis epidermis. Deze procedure is veel langzamer dan de flowcytometrische methode, terwijl ook de variatie coëfficiënt, die de analyse van de DNA verdelingen beïnvloedt, veel groter is. De auteurs slaagden er niettemin in, ondanks de moeilijkheden die inherent zijn aan de methode (Würthner et al., 1972), verschillen in DNA verdelingen tussen normale epidermis en psoriasis aan te tonen.

Haag et al. (1975) bestudeerden het DNA gehalte in nuclei van een suspensie van epidermiscellen. De auteurs geven echter geen nadere analyse van de verkregen histogrammen. Het aantal onderzochte cellen was bovendien beperkt.

Flowcytometrie, door Bauer et al. (1975) geïntroduceerd in de dermatologie en in dit proefschrift nader uitgewerkt, maakt het mogelijk schattingen van het gehalte aan DNA in de kernen van een groot aantal epidermiscellen te maken binnen korte tijd: meer dan 10^5 cellen kunnen binnen anderhalf uur na afname worden gemeten.

Het DNA histogram weerspiegelt de percentages cellen in de verschillende fasen van de celcyclus. De hier vermelde flowcytometrische metingen zijn uitgevoerd op epitheliale celsuspensies van de gehele levende epidermis. Niet alleen cellen in de G_1 fase van de celcyclus hebben een 2c DNA hoeveelheid. Ook een deel van de G_0 cellen (Gelfant, 1976) en de gedifferentieerde cellen in het stratum spinosum en stratum granulosum hebben een 2c hoeveelheid DNA in hun kernen. Het is derhalve niet juist cellen met een 2c hoeveelheid DNA als G_1 cellen te beschouwen.

Tevens hebben we bij deze studie aangenomen dat we alleen keratinocyten in de suspensie hebben. Dit is uiteraard niet waar. Andere celtypen zijn eveneens aanwezig maar in relatief kleine aantallen zodat, zelfs als zij een zeer afwijkende kinetiek zouden hebben, hun invloed op de gevonden waarden verwaarloosd kan worden.

Cellen in de G_2 en de M fase, die beide 4c DNA bevatten, kunnen met de flowcytometer niet van elkaar worden gescheiden.

Alle DNA verdelingen zijn geanalyseerd met een mathematisch model, waarin geen correctie voor de coïncidentie is opgenomen. De bijdrage van de coïncidentie aan het percentage S en G_2M is afhankelijk van de signaalwijdte de pulse rate. Omdat de ICP apparatuur geen mogelijkheid heeft de signaalwijdte te meten, hebben we een correctie voor de coïncidentie gemaakt op basis van calibratie curven.

De flowcytometrische metingen in deze studie zijn uitgevoerd op celsuspensies van de gehele levende epidermis. Het weergegeven percentage S heeft derhalve betrekking op alle levende epidermiscellen. Door het gevonden percentage S te

vermenigvuldigen met een factor 3,2, zijnde de ratio $N_{\text{totaal}} / N_{\text{cycl.}}$ (Halprin, 1972) wordt het aantal cellen in de S fase gerelateerd aan de proliferatieve celpopulatie gevonden. Bij vergelijking van het op deze wijze door ons gevonden percentage S, blijkt dit percentage goed overeen te stemmen met de gemiddelde waarde van een aantal labeling indices zoals deze in de literatuur worden vermeld (Potten, 1975).

De enige ons bekende studie aangaande DNA flowcytometrie van normale humane epidermis geeft waarden voor S en G₂M fractie (S: $3,0 \pm 0,6$; G₂M: $1,1 \pm 0,1$) die overeenstemmen met de hier vermelde. In deze studie zijn echter 14 monsters van één patient gemeten (Frentz et al., 1980).

Celcyclustijden (T_c) en turnovertijden (T_{turn ep.}) kunnen niet rechtstreeks met de onderhavige methode worden bepaald. De hier verrichte metingen kunnen slechts relatieve celcyclustijden geven. Een schatting kan echter worden gemaakt als T_s bekend is,

$$T_{\text{turn ep}} = -\frac{T_s}{\frac{S}{1-S}} \times 100 \quad (\text{cf. 3.6.3.})$$

Indien we aannemen dat T_s = 8 uur (gemiddelde waarde uit de literatuur, Gelfant, 1976).

$$T_{\text{turn ep}} = -\frac{8}{1,8} \times 100 = 444 \text{ uur} \\ = 18,5 \text{ dagen.}$$

Deze waarden komt overeen met turnovertijden zoals deze zijn berekend uit onderzoeken met gelabelde aminozuren (Rothberg et al., 1961).

De gemiddelde celcyclustijd bedraagt:

$$T_c = G.F. \times T_{\text{turn ep}} \quad (\text{cf. 3.6.3.})$$

$$T_c = -\frac{1}{3,2} \times 18,5 = 5,8 \text{ dagen} \\ = 139 \text{ uur.}$$

Uiteraard zijn dit ruwe schattingen.

In de statistische studies is geen correctie voor de coïncidentie aangebracht. Het is niet waarschijnlijk dat de coïncidentie bijdrage aan het percentage S en G_2M verschilt in de groepen die worden onderzocht.

In geen van de onderzochte parameters zijn verschillen gevonden tussen de beide geslachten.

Tabel 4.3. toont aan dat er in enkele van de gemeten parameters een leeftijdsafhankelijkheid bestaat. Meerdere interpretaties hiervoor zijn mogelijk. Het feit echter dat de ratio S/G_2M stijgt bij het ouder worden betekent dat de relatieve duur van de S fase t.o.v. de G_2M fase langer wordt. Bij veroudering treden er derhalve veranderingen in de celcyclus op.

Tabel 4.4. laat zien dat er "seizoens" variaties (strikt genomen, verschillen tussen twee specifieke tijden van het jaar) in het percentage cellen in S en G_2M fase bestaan. De ratio S/G_2M verandert niet. Op dit moment kunnen we slechts speculeren over de betekenis van deze verschillen, omdat we te weinig gegevens hebben. Een mogelijke verklaring kan zijn dat de groeifractie in de zomer hoger is dan in de winter; dat de duur van zowel de S als de G_2M fase in de zomer verlengd is of dat de G_1 fase verkort is bij gelijkblijvende S en G_2M fase.

Kleine verschillen in DNA verdeling bestaan er tussen de diverse plaatsen op het lichaam. In het bijzonder bij het vergelijken van arm met been komen er statistisch significante verschillen aan het licht in de 2c waarde (hoger in been) en G_2M waarde (lager in been). Het aantal DNA synthetiserende cellen is echter niet afhankelijk van de plaats. De knie, een plaats die voortdurend blootstaat aan mechanische prikkeling en tevens een van de predilectieplaatsen voor psoriasis, verschilt in de hier gemeten parameters niet van arm, been of rug. De gevonden plaatsverschillen zijn echter zo gering dat bij afname van monsters uit psoriasislaesies geen correctie voor de afnameplaats behoeft te worden gemaakt.

Bovenstaande meetresultaten tonen aan dat een aantal variabelen de gegevens beïnvloeden. Dit kan enkele van de tegenstrijdige gegevens, die men in de literatuur kan vinden aangaande celkinetische parameters van normale humane epidermis, verklaren. Op grond van de snelheid en het gemak waarmee de resultaten kunnen worden verkregen is flowcytometrie, ondanks de beperkingen van de hier gebruikte apparatuur, een geschikte methode gebleken om deze variabelen te bestuderen.

4.5. REFERENTIES.

Baisch, H. & Linden, W.A.: Different mathematical models for pulse cytophotometric evaluations applied to asynchronous and partially synchronized cell populations. In: Pulse-Cytophotometry, Part I, pp 68-76, Eds. Haanen, Hilben and Wessels, European Press Medikon, Ghent, Belgium), 1975.

Bauer, F.W. & De Grood, R.M.: Impulse cytophotometry in psoriasis. Br. J. Derm., 93:225-227, 1975.

Frentz, G., Moller, U. & Christensen, I.: DNA flow cytometry on human epidermis: I. Methodological studies on normal skin. J. Invest. Derm., 74:119-121, 1980.

Gelfant, S.: The cell cycle in psoriasis: a reappraisal. Br. J. Derm., 95:577-590, 1976.

Grove, G.L., Anderton, R.L. & Smith, J.G.: Cytophotometric studies of epidermal proliferation in psoriatic and normal skin. J. Invest. Derm., 66:326-238, 1976.

Haag, D., Tschahargane, C. & Ehemann, V.: Isolation of single cell nuclei from human epidermis for cytophotometric DNA measurements. Arch. Derm. Res., 253:301-310, 1975.

Halprin, K.M.: Epidermal "turnover time" - A re-examination. Br. J. Derm., 86:14-19, 1972.

Nie, N.H.: Statistical Package for the Social Sciences, McGraw-Hill, London, 1975.

Potten, C.S.: Epidermal cell production rates. J. Invest. Derm., 65:488-500, 1975.

Rothberg, S., Crounse, R.G. & Lee, J.L.: Glycine-C¹⁴ incorporation into the proteins of normal stratum corneum and the abnormal stratum corneum of psoriasis. J. Invest. Derm., 37: 497-505, 1961.

U.R.C. (Universitair Reken Centrum) Nijmegen: Release 7.02 on I.B.M. 370/158., 1979.

Wurthner, K., Sachs, H. & Bahnsen, J.: Zum Problem der Kernanschnitte bei der Zytphotometrie an histologischen Präparaten. Histochemie, 32:261-270, 1972.

DNA DISTRIBUTIE IN LAESIES EN KLINISCH NIET AANGETASTE
EPIDERMIS VAN PSORIASISPATIENTEN.

- 5.1. Inleiding
- 5.2. Materiaal en methode
- 5.3. Resultaten
 - 5.3.1. Psoriasis vulgaris
 - 5.3.2. Interindividuele en intraindividuele variantie
 - 5.3.3. Intralaesionale variantie
 - 5.3.4. Onrustige psoriasis
 - 5.3.5. Psoriasis pustulosa
 - 5.3.6. Klinisch niet aangetaste epidermis bij psoriasis
- 5.4. Discussie
- 5.5. Referenties

DNA DISTRIBUTIES IN LAESIES EN KLINISCH NIET AANGETASTE EPIDERMIS VAN PSORIASISPATIENTEN.

5.1. INLEIDING.

Psoriasis wordt gekenmerkt door een aantal veranderingen in de epidermiscellen. Er is een toename van het totale aantal cellen per eenheid huidoppervlak (Van Scott & Ekel, 1963), van het aantal proliferatieve cellen (Goodwin et al., 1974), van de grootte van de cellen (Fry & McMinn, 1968), van het celoppervlak (Gommans et al., 1979) en van het aantal mitosefiguren (cf. 2.5.1.).

Bovendien is men in de literatuur eensgezind van mening, dat de celcyclustijd van een psoriasiscel korter is dan van een normale epidermiscel (cf. 2.9.). De door diverse auteurs gevonden waarden voor labelling index en celcyclustijd verschillen echter aanzienlijk (Gelfant, 1976; Grove, 1979; cf. 2.9.). Over de celkinetiek van de klinisch normale epidermis bij personen met psoriasis zijn de meningen verdeeld. Wohlrab & Grunberg (1966) en Weinstein & Frost (1968) vinden geen verschillen; Hell & Hodgson (1966), Braun-Falco et al. (1967), Kaidby & Kurban (1971), Goodwin et al. (1973) vinden daarentegen een toename van de mitotische en labelling indices in de klinisch normale epidermis bij psoriasis vergeleken met normale epidermis.

Alle tot nu toe uitgevoerde studies over de celkinetische aspecten van psoriasiscellen zijn aan statistische beperkingen onderhevig. De vraag werpt zich op of de in de literatuur gevonden verschillen in aantal DNA synthesiserende cellen berusten op methodieke verschillen of dat er sprake is van een grote intra- en interindividuele variabiliteit. Flowcytometrie maakt het mogelijk het DNA gehalte van vele individuele cellen bij een groot aantal personen te bepalen.

Het doel van dit hoofdstuk is statistisch meer betrouwbare informatie te verkrijgen over de DNA verdelingen in cellen afkomstig uit psoriasislaesies. Op klinische gronden zijn drie typen psoriasis onderscheiden: de chronisch verlopende psoriasis vulgaris, waarbij de laesies vrijwel inert zijn, de onrustige psoriasis en de zeer heftig verlopende psoriasis pustulosa.

De intralaesionale verschillen in DNA verdeling zijn bepaald teneinde na te gaan of bij het vergelijken van de interlaesionale verschillen rekening moet worden gehouden met de plaats van afname in de laesie.

Op grond van het klinisch aspect, het natuurlijk beloop en de reactie op therapie rijst de vraag of elke patient zijn "eigen" psoriasis heeft. Teneinde deze hypothese te toetsen zijn de verschillen tussen diverse laesies van hetzelfde type psoriasis bij dezelfde persoon en de verschillen tus-

sen personen met hetzelfde type psoriasis vergeleken.

5.2. MATERIAAL EN METHODE.

De huidbiopten zijn genomen op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze uit laesies van patienten met een klinisch manifeste psoriasis vulgaris, die tot minimaal een week voor afname geen therapie hadden ontvangen. Alle biopten zijn in de periode juni-juli afgenomen.

De spreiding binnen eenzelfde laesie is bepaald door een aantal biopten te nemen langs een rechte lijn door het midden van de afwijking. Afhankelijk van de grootte van de afwijking zijn meerdere monsters uit rand en centrum genomen. Onder rand wordt verstaan de buitenste anderhalve centimeter van de afwijking.

De interlaesionale verschillen bij eenzelfde persoon zijn bepaald door uit het centrum van een aantal willekeurige, gelijk uitzijnde psoriasisplekken huidmonsters te nemen. De biopten bij de personen met een zich snel uitbreidende psoriasis pustulosa zijn gelijktijdig genomen uit de normaal uitzijnde huid op een plaats waar te verwachten was dat de laesie zou passeren, uit de huid voor het front waar reeds veranderingen zichtbaar waren, uit het front en op een plaats achter de voortkruipende rand, waar na een massale afstoting van necrotisch epitheel, een weer min of meer gave huid resteerde.

De proliferatiepatronen van de huidbiopten zijn met de flow-cytometer op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze bepaald.

De statistische verwerking van de aldus verkregen gegevens geschiedde met SSPS subprogramma's (Nie, 1975; U.R.C., 1979).

5.3. RESULTATEN.

5.3.1. PSORIASIS VULGARIS.

De gemiddelde percentages voor de diverse fracties van de celcyclus zijn samengevat in tabel 5.1.. Deze verschillen significant van de overeenkomstige percentages voor normale epidermis ($P \leq 0.01$).

Tabel 5.1. geeft ook de waarden gecorrigeerd voor de coïncidentie weer.

Vergeleken met normale epidermis is de variatie tussen de individuele specimens groot. Dit kan berusten op meerdere factoren: op verschillen in de laesie zelf, op variatie tussen verschillende laesies bij één persoon en op interindividuele verschillen.

Het aandeel van elk van deze factoren is onderzocht.

Tabel 5.1.

Psoriasis vulgaris				n = 94
	2C	S	G ₂ M	S/G ₂ M
A	87,4 ± 3,4	9,7 ± 2,6	2,9 ± 1,4	4,1 ± 2,2
B	89,5	9,0	2,5	-

Tabel 5.1.: Analyse van de DNA verdelingen in psoriasis vulgaris laesies. A: gebaseerd op de planimetrische methode. B: gecorrigeerd voor de coïncidentie (gemiddelde pulse rate 250 cellen per seconde).

5.3.2. INTERINDIVIDUELE EN INTRAINDIVIDUELE VARIANTIE.

Bij de analyse van oorzaken van deze variabiliteit is gebruik gemaakt van de variantie in plaats van de standaard deviatie. De variantie voor psoriasis laesies is gebaseerd op een populatie van 94 monsters van 17 personen. De vraag rijst of deze populatie homogeen is t.o.v. de persoon, m.a.w. of de variantie in de subpopulatie biopsieën van eenzelfde patient evengroot als of significant kleiner dan de variantie in de totale populatie is.

Hiervoor is een -one way- variantie analyse met factor patient nummer uitgevoerd. De variantie is gescheiden in een inter- en een intraindividuele component (tabel 5.3.).

Tabel 5.3.

	2C*	S*	G ₂ M*	S/G ₂ M*
Interindividuele variantie	6,6	4,8	2,6	3,3
Intraindividuele variantie	2,2	1,8	1,0	1,9
Verklaarde variantie	64%	61%	57%	39%

* $P \leq 0.01$

Tabel 5.3.: Variantie analyse in inter- en intraindividuele componenten.

Tussen verschillende plekken van klinisch hetzelfde type psoriasis bij eenzelfde persoon alsook tussen de verschillende patienten bestaan aanzienlijke verschillen. Tabel 5.2. geeft dit illustratief weer.

Tabel 5.2.

Pat.	No	Plaats	G ₁	S	G ₂ M	Ratio
I	1	li.boven-been	82,6	14,0	3,4	4,1
	2	dij	82,4	12,2	5,4	2,3
	3	rug	84,6	11,1	4,3	2,6
	4	rug	78,4	14,7	6,8	2,2
	5	onderarm	85,7	11,6	2,7	4,3
	6	borst	80,7	14,6	4,7	3,1
	7	borst	81,7	13,4	4,9	2,7
II	1	dij	89,1	7,8	3,1	2,5
	2	dij	90,7	7,0	2,3	3,0
	3	been	90,3	6,6	3,0	2,2
	4	re.arm	89,5	7,6	2,8	2,7
	5	li.arm	93,6	5,3	1,1	4,8
	6	sacrum	88,9	6,8	4,2	1,6
	7	sacrum	91,5	5,6	2,9	1,9
III	1	rug	90,7	7,1	3,2	2,2
	2	been	87,2	10,7	2,0	5,4
	3	buik	84,0	13,0	3,0	4,3
	4	rug	91,2	7,4	1,3	5,7
	5	rug	88,9	8,6	2,5	3,4
	6	rug	83,5	14,1	2,3	6,1

Tabel 5.2.: Overzicht van de DNA verdelingen in procenten en de ratio S/G₂M van een aantal willekeurig gekozen psoriasis vulgaris laesies bij drie personen. De hier weergegeven percentages zijn illustratief voor de verschillen tussen de personen en voor de spreiding die binnen één persoon kan bestaan.

Uit tabel 5.3. kan worden geconcludeerd dat de individuele subpopulaties significant meer homogeen zijn dan de totale populatie. Minimaal 39% en maximaal 64% van de totale variantie wordt verklaard door interindividuele verschillen. Het aantal biopsieën en de afnameplaats waren niet identiek voor alle patienten. Een -two way- analyse van plaats en patient nummer gaf geen significante toename van de verklaarde variantie.

5.3.3. INTRALAESIONALE VARIANTIE.

Teneinde na te gaan of een psoriasislaesie kinetisch homogeen is zijn in totaal 31 biopsieën gemeten uit het centrum en de rand van 6 psoriasis vulgaris laesies. Voor dit onderzoek zijn de huidmonsters van elk individu genomen uit een enkele laesie. De plaats van de laesie was niet gelijk voor elke patient (tabel 5.4.).

Tabel 5.4.

Patient no	rand			centrum		
	been	rug	abdomen	been	rug	abdomen
1		2			1	
2		2			1	
3			4			3
4		4			5	
5	2			3		
6			2			2
totaal	2	8	6	3	7	5

Tabel 5.4.: Samenvatting van de biopsieplaatsen van elke patient.

De significantie van de mogelijke verschillen van de gemiddelde waarde van elke patient tussen rand en centrum van de laesie is bepaald met de Student's t-test ervan uitgaande dat de monsters waren gepaard aan de patient.

Tabel 5.5. toont dat er geen significant verschil in de hier onderzochte parameters is tussen rand en centrum van psoriasislaesies.

Tabel 5.5.

verschil centrum-rand								
n	2c*		S*		G ₂ M*		S/G ₂ M*	
	gemid.	s.d.	gemid.	s.d.	gemid.	s.d.	gemid.	s.d.
6	0,04	3,3	-0,61	2,8	0,58	1,0	-0,42	1,5
* P > 0,1								

Tabel 5.5.: Student's t-test op het verschil in gepaarde waarnemingen van de gemiddelde waarden van centrum en rand van psoriasislaesies bij 6 patiënten.

5.3.4. ONRUSTIGE PSORIASIS.

De DNA verdelingen in celsuspensies afkomstig van personen met een onrustige psoriasis geven een lichte maar duidelijk significante verhoging van het percentage S te zien. Het percentage G₂M en de ratio S/G₂M zijn niet significant verschillend van de overeenkomstige parameters van psoriasis vulgaris laesies (tabel 5.6.).

Tabel 5.6.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Onrustige psoriasis	15	85,5 ± 1,3	11,8 ± 1,1	2,7 ± 0,8	5,0 ± 2,5
Psoriasis vulgaris	94	87,4 ± 3,4	9,7 ± 2,5	2,9 ± 1,4	4,1 ± 2,2
Significantie		p = 4%	p = 0,2%	p = 56%	p = 14%

Tabel 5.6.: Vergelijking van de analyses van de DNA verdelingen van celsuspensies afkomstig uit laesies van onrustige psoriasis en van psoriasis vulgaris.

5.3.5. PSORIASIS PUSTULOSA.

Het klinisch beeld bij personen met een psoriasis pustulosa is van patient tot patient verschillend. De laesies lopen als het ware als een golf in enkele dagen tijd over vaak grote gebieden van het lichaam.

Tabel 5.7. geeft een overzicht van de DNA distributie in de klinisch normale huid en de aangetaste huid resp. voor, in en achter het voortschrijdend front van de laesie.

Tabel 5.7.

Pat.no.		2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
I	Normale huid	94,0	3,3	2,7	1,2
	Voor het front	83,7	10,2	6,0	1,7
	Front	76,3	17,3	6,4	2,7
	Achter het front	90,4	6,7	2,8	2,4
=====					
II	Normale huid	92,7	4,9	2,4	2,0
	Voor het front	87,3	9,6	3,1	3,1
	Front	76,6	18,7	4,6	4,1
	Achter het front	92,1	5,7	2,2	2,6
=====					
III	Normale huid	94,0	4,1	1,9	2,2
	Voor het front	83,9	13,5	2,6	5,2
	Front	79,4	18,2	2,5	7,3
	Achter het front	90,6	7,5	1,9	3,9

Tabel 5.7.: Analyse van de DNA verdelingen in de klinisch normale huid en resp. vóór, in en achter de rand van de zich uitbreidende psoriasis pustulosa laesie.

5.3.6. KLINISCH NIET AANGETASTE EPIDERMIS BIJ PERSONEN MET PSORIASIS.

De gevonden percentages voor 2c, S en G₂M, alsmede de ratio S/G₂M zijn weergegeven in tabel 5.8. In deze tabel zijn ook de waarden na correctie voor de coïncidentie vermeld. De gevonden waarden verschillen significant van de waarden voor normale epidermis ($p \leq 0,01$). De ratio vertoont geen significant verschil (tabel 5.9.).

Tabel 5.8.

	Klinisch niet aangetaste epidermis				n = 47
	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M	
A	94,5 ± 2,0	3,8 ± 1,4	1,8 ± 0,8	2,3 ± 0,8	
B	95,4	3,1	1,5	-	

Tabel 5.8.: Analyse van de DNA verdelingen in klinisch niet aangetaste psoriasis epidermis bij 47 huidmonsters. A: gebaseerd op de planimetrische methode. B: gecorrigeerd voor de coïncidentie (gemiddelde pulse rate 250 cellen per seconde).

Tabel 5.9.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Normale epidermis	60	95,9	2,8	1,3	2,6
Klin. normale epidermis bij psoriasis	47	94,5	3,8	1,8	2,3
Significantie p		0,1%	0,1%	0,1%	18%

Tabel 5.9.: Vergelijking van de DNA verdelingen in normale en niet aangetaste epidermis bij psoriasis.

In tabel 5.10. worden de gemeten gemiddelde waarden voor de diverse fracties van de celcyclus weergegeven voor normale epidermis, klinisch niet aangetaste epidermis bij psoriasis en voor psoriasis vulgaris laesies.

Tabel 5.10.

	normale epidermis n = 60	niet aangetaste epidermis n = 47	psoriasis laesie n = 94
2c	95,9 ± 1,1	94,5 ± 2,0	87,4 ± 3,4
S	2,7 ± 0,8	3,8 ± 1,4	9,7 ± 2,5
G ₂ M	1,3 ± 0,6	1,8 ± 0,8	2,9 ± 1,4
S/G ₂ M	2,6 ± 1,1	2,3 ± 0,8	4,1 ± 2,2

Tabel 5.10: Overzicht van de analyses van de DNA verdelingen in procenten van epidermiscellen uit normale epidermis, niet aangetaste epidermis bij personen met psoriasis en uit psoriasislaesies.

5.4. DISCUSSIE.

Ook van op bovenbeschreven wijze geprepareerde epidermiscellen uit een psoriasislaesie is het goed mogelijk met behulp van de flowcytometer DNA verdelingen te verkrijgen. De bijdrage van de coïncidentie aan het percentage S en G₂M is bij psoriascellen relatief geringer dan bij normale epidermiscellen. De analyse van de G₂M piek wordt niet in meerdere mate gestoord door klontjesvorming.

In de DNA verdeling van cellen uit onbehandelde psoriasis vulgaris laesies wordt een toename van het aantal cellen in de S en G₂M fase gezien. Omdat deze percentages van cellen in S en G₂M betrekking hebben op het totale aantal epidermiscellen en niet op de proliferatieve cellen alleen, kunnen deze percentages niet direct worden vergeleken met labelling indices gevonden bij autoradiografische studies. Ook bij deze onderzoeksmethode wordt echter een toename van het S compartiment gevonden bij psoriasis vergeleken met normale epidermis.

Vergelijking van de hier weergegeven meetresultaten met die in de bestaande literatuur is van beperkte waarde gezien de diversiteit van vroegere onderzoeken. Het overzicht van Gelfant (1976) onderstreept dit nogmaals. Het is duidelijk dat een onafhankelijke techniek als flowcytometrie van grote waarde kan zijn. De onderhavige bevindingen ondersteunen de autoradiografische bevindingen van Born & Kalkoff (1969) en Pullmann, Lennartz & Steigleder (1977) dat de duur van de S fase is verlengd in de psoriasislaesie, ofschoon andere verklaringen mogelijk zijn, b.v. een korter worden van de tijdsduur van G₂M.

Bij psoriasis verschuift de ratio S/G₂M naar hogere waarden dan bij normale epidermis. De relatief kleine veranderingen

in deze ratio lijken in strijd te zijn met de bevindingen van Goodwin, Hamilton & Fry (1973) die de ratio gemerkte cellen en mitotische cellen bestudeerden. Zij vonden een ratio van 25:1 bij klinische psoriasis, van 190:1 bij niet aangetaste psoriasis epidermis en van 450:1 bij normale epidermis. Bij aanname dat gemerkte cellen in de S fase zijn zou dit betekenen dat de duur van de S fase zich t.o.v. mitoseduur verhoudt als 450:1 in normale epidermis. Bij een S fase duur van 8 uur zou de duur van de mitosefase ongeveer 1 minuut bedragen. Het ligt meer voor de hand aan te nemen dat de gemerkte cellen voor een groot deel reflecteren wat is genoemd "metabool DNA", een suggestie die reeds door deze auteurs is gedaan. Flowcytometrie daarentegen meet DNA hoeveelheid en een cel met een DNA hoeveelheid tussen 2C en 4C zal daarom waarschijnlijk een cel in de S fase zijn.

Een verder punt dat de duidelijke verschillen kan verklaren is dat tijdens de preparatieprocedure met het proteolytisch enzym pepsine cellen in de mitosefase worden vernietigd (Beck, 1977). Voor trypsine geldt dit mogelijk ook. Het percentage 4C cellen reflecteert dan meer G₂ dan G₂M. Veranderingen in de duur van de mitosefase zullen dan niet worden geregistreerd.

Uit bovenstaande metingen blijkt in de percentages 2c, S en G₂M een aanzienlijke spreiding te bestaan. Deze kan een partiële verklaring vormen voor de spreiding in de in de literatuur vermelde labelling indices. De intralaesionale spreiding in de percentages blijkt gering te zijn. Deze betrekkelijke homogeniteit is in overeenstemming met de histologische bevindingen van Fry & McMinn (1970) en van Beek & van Reede (1977). Daarentegen vinden Soltani & van Scott (1972) in de rand van de laesie een hogere mitotische index, terwijl Christophers et al. (1973) met behulp van autoradiografie in het centrum meer DNA synthetiserende cellen vinden dan in de rand van de laesie. De bevindingen van Soltani & Van Scott (1972) zijn niet noodzakelijkerwijs in tegenspraak met de hier beschreven resultaten indien bij de preparatieprocedure van de epidermiscellen mitosen worden beschadigd. De verschillen in M.I. weerspiegelen dan een verlenging van Tm in de periferie van de laesie. De variabiliteit in de gevonden DNA verdelingen berust voornamelijk op de interindividuele verschillen. Gezien deze bevindingen wordt de sterk individueel bepaalde reactie op eenzelfde therapie van personen met klinisch gelijk uitziende psoriasislaesies verklaarbaar. Op analoge wijze moet het voor de diverse laesies soms sterk uiteenlopende therapieresultaat bij dezelfde persoon worden gezien.

In tegenstelling tot de verwachting op grond van het klinisch beeld is de verhoging van het percentage S bij onrustige psoriasis verrassend gering vergeleken met psoriasis vulgaris.

In de snel voortschrijdende rand van een psoriasis pustulosa laesie blijkt meer dan 1/3 van de prolifererende cellen zich in de synthese fase te bevinden. De verandering in percentage G_2M ligt, behalve bij patient 1, niet in de orde van grootte van die van het percentage S. De hier weergegeven percentages stemmen overeen met de door Bauer & Mali (1975) gevonden waarden bij psoriasis pustulosa. De klinische bevinding dat de epidermis na het passeren van het front weer redelijk normaal wordt, wordt door deze metingen bevestigd.

Evenals bij normale epidermiscellen (hoofdstuk 4) kan het percentage S of G_2M verkregen uit flowcytometrische metingen van psoriasis cellen worden gebruikt voor de berekening van de turnovertijd van het levende epitheel als de duur van de S of G_2M fase bekend is. Uitgaande van de gevonden waarden 4,1 en 2,6 voor de ratio's S/ G_2M in psoriasislaesie en normale huid en van een T_s in normale huid van 8 uur (Gelfant, 1976) kan worden berekend dat:

$$T_s \text{ (laesie)} = -\frac{4,1}{2,6} \times 8 = \pm 13 \text{ uur.}$$

De turnovertijd bedraagt dan:

$$\begin{aligned} T_{\text{turn ep}} &= -\frac{T_s}{\%S} \times 100 \\ &= -\frac{13}{9,7} \times 100 = 134 \text{ uur} = \pm 5,5 \text{ dagen.} \end{aligned}$$

Deze berekening berust op de veronderstelling dat de verandering in de ratio wordt veroorzaakt door een verlenging van de S fase duur terwijl $T-G_2M$ onveranderd blijft. De aldus gevonden waarden stemmen in grote lijnen overeen met de schattingen van Van Scott & Ekel (1963) gebaseerd op morphometrische metingen en mitose tellingen. De celcyclustijd (T_c) krijgt een waarde van 67 uur wanneer we aannemen dat de verhouding prolifererende en gedifferentieerde cellen ongeveer 1:1 bedraagt (Weinstein & Housman, 1972). Dit is uiteraard een ruwe schatting waarbij nog individuele verschillen kunnen optreden.

Voor psoriasis epidermis is algemeen aanvaard dat alle prolifererende cellen inderdaad aan de celcyclus deelnemen. Voor normale huid bestaat hierover twijfel (Gelfant, 1976). De geschatte T_c van 139 uur voor normale epidermis (hoofdstuk 4) is gebaseerd op de aanname dat alle prolifererende cellen aan de cyclus deelnemen. Indien slechts een deel van de cellen aan de celcyclus deelnemen wordt de celcyclustijd

korter. In feite zou het weleens zeer de vraag kunnen zijn of de celcyclustijd van een psoriasiscel zoveel korter is dan die van een normale epidermiscel. De abnormale celproductie moet dan geheel worden verklaard in termen van het aantal daadwerkelijk prolifererende cellen per eenheid oppervlak, hetgeen door Chopra & Flaxman (1974) uit in vitro-studies is gesuggereerd. In verband hiermee is het onderzoek van Heenen et al. (1979) van belang. Uit computer simulatie studies concluderen zij dat een tijdelijke verschuiving in het normale evenwicht tussen de mate van celflow naar het gedifferentieerde en die naar het proliferatieve compartiment voldoende is om een permante toename in de germinatieve populatie te veroorzaken; dus zonder een verandering in de duur van de celcyclustijd zelf kan een verandering in epidermale morfologie in de richting van psoriasis worden gesimuleerd. De in dit hoofdstuk gevonden meetresultaten lijken deze hypothese te steunen ofschoon kleine veranderingen in de duur van de afzonderlijke celcyclusfasen bestaan (verlenging van de S fase). In het licht van deze bevindingen verdient het concept van Gelfant (1978) aandacht dat bij de behandeling van psoriasis die therapiemethode waarbij psoriascellen worden gehinderd vanuit de G_0 fase in de celcyclus te treden, bij voorkeur moeten worden onderzocht.

Morfologisch kan geen onderscheid worden gemaakt tussen normale epidermis en "gezonde" epidermis van personen met psoriasis. In het verleden hebben een aantal onderzoekers een verhoogde M.I. en labelling index in de "latent psoriatische epidermis" opgemerkt. De spreiding was echter zo groot dat in het individuele geval geen uitspraak over een eventuele psoriasis dispositie bij een persoon zonder klinische manifestatie van de ziekte kon worden gedaan (Braun-Falco et al., 1967; Born & Kalkoff, 1969).

Voor alle celcyclusfasen verschillen de met de flowcytometer gevonden DNA verdelingen significant van die voor normale epidermis. Deze bevinding kan op meerdere manieren worden verklaard. De percentages voor de S en G_2M fracties liggen tussen die voor normale en psoriasis epidermis in. Het verhoogde percentage S kan worden verklaard door een langere Ts bij een gelijkblijvende totale celcyclustijd, zoals door Pullmann (1974, 1978) is gevonden. Het feit dat de ratio S/G_2M niet groter wordt pleit hiertegen. Bovendien is het langer worden van de duur van de synthesefase omstreden (Weinstein & Frost, 1968; Chopra & Flaxman, 1974). De meest waarschijnlijke verklaring voor deze stijging is dat ook in de niet aangetaste epidermis de celcyclus reeds verkort is of dat de groeifractie is verhoogd. Op grond van bovengenoemde bevinding dat er mogelijk geen grote verschillen in celcyclustijd tussen normale en psoriasis epidermis zijn kan de toename van S en G_2M worden verklaard door het feit dat in de niet aangetaste psoriasis huid de ratio non-cycling en wel de celcyclus doorlopende cellen verandert ten gunste van de laatste. Na een geëlgende stimulus zou deze ratio dan verder kunnen veranderen en leiden tot een klinisch manifeste psoriasislaesie. De niet aangetaste psoriasis epidermis rea-

geert op uiteenlopende noxen (mechanische, toxische, allergische), mits deze zowel het epitheel als het stratum papillare treffen, met de vorming van efflorescenties die kenmerkend zijn voor psoriasis (Heber, 1974); het isomorf prikkel-effect (Koebner, 1877). Anderzijds kan ook een endogene stimulus b.v. in het kader van een infectie of geneesmiddelen-exantheem, psoriasis provoceren (Steigleder & Orfanos, 1967). Gezien onze meetresultaten lijken de niet aangetaste epidermiscellen reeds continu in een toestand van verhoogde proliferatieactiviteit. Een aspecifieke stimulus is kennelijk voldoende om de reeds veranderde regulatie van de groei verder te laten ontsporen.

De ratio S/G_2M in de niet aangetaste epidermis verandert niet ten opzichte van normale epidermis. Deze waarneming lijkt de bevindingen van Steigleder & Pullman (1979) dat T_s in de niet aangetaste psoriasis epidermis is verlengd, niet te ondersteunen.

Flowcytometrische metingen van psoriasiscellen en van niet aangetaste epidermiscellen bij psoriasis geven nieuwe waarden en inzichten die echter aan grote beperkingen onderworpen zijn. Toekomstig onderzoek met multi-parameter flowcytometers, die het mogelijk moeten maken onderscheid te maken tussen gedifferentieerde keratinocyten en prolifererende epidermiscellen, en met flowcytometrische stathmokinetic methoden teneinde absolute celcyclustijden te verkrijgen, moet een verder inzicht geven in de celkinetische eigenschappen van psoriasiscellen.

5.5. REFERENTIES.

Bauer, F.W. & Mali, J.W.H.: Use of cytophotometry for studying cell kinetics in a case of psoriasis pustulosa et arthropathica, *Dermatologica*, 151:164-167, 1975.

Beck, H.P.: Effect of pepsin pretreatment on pulse cytometric DNA histograms. *Cell and tissue Kinet.*, 10:265-269, 1977.

Beek, C.H. & van Reede, E.C.: The nature and frequency of the histological changes found in psoriasis vulgaris. *Arch. Derm. Res.*, 257:255-264, 1977.

Born, W. & Kalkoff, K.W.: Zur DNS-Synthese der psoriatischen Epidermiszelle. *Arch. klin. exp. Derm.*, 236:43-52, 1969.

Braun-Falco, O., Christophers, E. & Kurban, A.: Abnormales Verhalten der epidermalen Regeneration bei Patienten mit Psoriasis vulgaris. *Arch. klin. exp. Derm.*, 229:276-284, 1967.

Chopra, D.P. & Flaxman, B.A.: Comparative proliferative kinetics of cells from normal human epidermis and benign epidermal hyperplasia (psoriasis) in vitro. *Cell and Tissue Kinet.*, 7:69-76, 1974.

Christophers, E., Parzefall, R. & Braun-Falco, O.: Initial events in psoriasis: quantitative assessment. *Br. J. Derm.*, 89:327-334, 1973.

Fry, L. & McMinin, R.M.H.: The action of chemotherapeutic agents on psoriasis epidermis. *Br. J. Derm.*, 80:373-383, 1968.

Fry, L. & McMinin, R.M.H.: Observations on mitosis in psoriatic epidermis. *Br. J. Derm.*, 82:19-22, 1970.

Gelfant, S.: The cell cycle in psoriasis: a reappraisal, *Br. J. Derm.*, 95:577-590, 1976.

Gelfant S.: Guest editorial. Understanding chemotherapy of psoriasis in terms of epidermal cell proliferation. *Cell and Tissue Kinet.*, 11:577-579, 1978.

Gommans, J.M., Bergers, M., van Erp, P., van den Hurk, J., Mier, P.D., Roelfzema, H.: Studies on the plasma membrane of normal and psoriatic keratinocytes. *Br. J. Derm.*, 101: 407-412, 1979.

Goodwin, P., Hamilton, S. & Fry, L.: A comparison between DNA synthesis and mitosis in uninvolved and involved psoriatic epidermis and normal epidermis. *Br. J. Derm.*, 89: 613-618, 1973.

Goodwin, P., Hamilton, S. & Fry, L.: The cell cycle in psoriasis. *Br. J. Derm.*, 90:517-524, 1974.

Grove, G.L.: Epidermal cell kinetics in psoriasis, present status. *Int. J. Derm.*, 18:111-119, 1979.

Heber, W.: Isomorpher Reizeffekt bei Psoriasis vulgaris. *Hautarzt*, 25:211-218, 1974.

Heenen, M., De Martelaer, V. & Galand, P.: Psoriasis and cell cycle: a computer simulation. *Acta Dermatovener. (Stockholm) Suppl.*, 87:73-82, 1979.

Hell, E. & Hodgson, C.: The uptake of H^3 -thymidine by epidermal cells in normal and psoriatic subjects. *Br. J. Derm.*, 78:262-268, 1966.

Kaidbey, K.H. & Kurban, A.K.: Mitotic behaviour of the buccal mucosal epithelium in psoriasis. *Br. J. Derm.*, 85:162-166, 1971.

Koebner, H.: Zur Aetiologie der Psoriasis. *Vjschr. Derm. Syph.*, 4:203-207, 1877.

Nie, N.H.: Statistical Package for the Social Sciences. Mc. Graw-Hill, London, 1975.

Pullmann, H., Lennartz, K.J. & Steigleder, G.K.: In vitro examination of cell proliferation in normal and psoriatic epidermis with special regard to diurnal variations. *Arch. Derm. Forsch.*, 250:177-184, 1977.

Pullmann, H.: Autoradiographie-Untersuchung der Zellproliferation bei Psoriasis vulgaris. *Grosse Scripta 3*, Grosse Verlag, Berlin, 1978.

Soltani, K. & Van Scott, E.J.: Patterns and sequence of tissue changes in incipient and evolving lesions of psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 106:484-490, 1972.

Steigleder, G.K. & Orfanos, C.E.: Provozierte Psoriasis. *Hautarzt*, 18:508-514, 1967.

Steigleder, G.K. & Pullmann, H.: Cell proliferation in psoriasis. *Acta Dermatovener. (Stockholm) Suppl.*, 87:64-72, 1979.

U.R.C. (Universitair Reken Centrum) Nijmegen, Release on I.B.M. 370/158, 1979.

Van Scott, E.J. & Ekel, T.M.: Kinetics of hyperplasia in psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 88:373-381, 1963.

Weinstein, G.D. & Frost, P.: Abnormal cell proliferation in psoriasis. *J. Invest. Derm.*, 50:254-259, 1968.

Weinstein, G.D. & Housman, R.: Interrelationship of epidermal proliferative and differentiated cell kinetics. *J. Invest. Derm.*, 58:265-272, 1972.

Wohlrab, W. & Gruneberg, T.: Histochemische Befunde an der klinisch gesunden Haut von Psoriatikern. Arch. klin. exp. Derm., 225:259-266, 1966.

DNA DISTRIBUTIE IN ENKELE ANDERE DERMATOSEN.

- 6.1. Inleiding
- 6.2. Materiaal en methode
- 6.3. Resultaten
 - 6.3.1. Neurodermitis
 - 6.3.2. Lichen ruber planus
 - 6.3.3. Morbus Darier (dyskeratosis follicularis)
 - 6.3.4. Normale epidermis versus niet aangestaste epidermis bij personen met neurodermitis, resp. lichen ruber planus, resp. M. Darier
 - 6.3.5. Normale epidermis versus laesie van neurodermitis, lichen ruber planus en M. Darier
 - 6.3.6. Psoriasis vulgaris versus neurodermitis, lichen ruber planus en M. Darier
- 6.4. Discussie
- 6.5. Referenties

DNA DISTRIBUTIE IN ENKELE ANDERE DERMATOSEN.

6.1. INLEIDING.

De DNA verdeling in psoriasiscellen is significant verschillend van die in normale epidermiscellen. In antwoord op de vraag of deze veranderingen specifiek voor psoriasis zijn, is bij een drietal genetisch bepaalde huidaandoeningen, die slechts onder bepaalde omstandigheden manifest worden, en waarbij mogelijk een storing in het verhoorningsproces bestaat, de DNA verdeling in de epidermiscellen bepaald. Neurodermitis is gekozen op grond van de vaak grote overeenkomsten in histologisch beeld met psoriasis. Lichen ruber planus is een storing in het verhoorningsproces van de epidermiscellen, hetgeen zich uit in verdikking van het stratum granulosum en stratum corneum. Morbus Darier (dyskeratosis follicularis) tenslotte is gekozen op grond van het feit dat hier eveneens sprake is van een verhoorningsstoornis, die histologisch beperkt is tot de epidermis. Ook in de niet aangetaste psoriasishuid zijn verschillen in DNA verdeling t.o.v. normale epidermiscellen aantoonbaar. Het lijkt zinvol bij bovengenoemde dermatosen de DNA distributie van de cellen in de niet aangetaste epidermis te bepalen.

6.2. MATERIAAL EN METHODE.

De monsters zijn genomen uit nog niet behandelde laesies van neurodermitis, lichen ruber planus en M. Darier van personen die de polikliniek dermatologie bezochten. Tevens zijn bij een aantal van deze personen monsters genomen uit de normaal uitziende huid van indien mogelijk arm of rug. Alle metingen vonden plaats in de periode juni-juli. De proliferatiepatronen van de monsters zijn op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze bepaald. De statistische analyse geschiedde met de simpele t-test en is uitgevoerd met SPSS subprogramma's (Nie, 1975; U.R.C., 1979). De significantie is getoetst op een onbetrouwbaarheidsgrens van 5%.

6.3. RESULTATEN.

6.3.1. NEURODERMITIS.

Tussen de gemiddelde percentages voor de diverse fracties van de celcyclus van resp. neurodermitis-cellen en epi-

dermiscellen uit de niet aangetaste huid van personen met neurodermitis bestaan wat betreft de 2c en S fractie significante verschillen. De G_2M fractie en de ratio S/G_2M zijn niet significant verschillend (tabel 6.1.).

Tabel 6.1.

	n	2c	S	G_2M	S/G_2M
Laesie	18	$91,3 \pm 3,1$	$6,1 \pm 1,6$	$2,5 \pm 1,9$	$3,9 \pm 4,1$
Niet aangetaste huid	10	$95,8 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,4$
Significantie p		< 0,1%	< 0,1%	9%	15%

Tabel 6.1.: Analyse van de DNA verdelingen in procenten in laesies en niet aangetaste huid van personen met neurodermitis met behulp van de t-test.

6.3.2. LICHEN RUBER PLANUS.

Tussen laesies en niet aangetaste huid bij personen met lichen ruber planus bestaan wat betreft de hier onderzochte parameters geen significante verschillen. Ook de ratio's S/G_2M van de niet aangetaste huid en van de laesie bij deze aandoening zijn niet significant verschillend (tabel 6.2.).

Tabel 6.2.

	n	2c	S	G_2M	S/G_2M
Laesie	6	$94,9 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,5$
Niet aangetaste huid	7	$94,9 \pm 1,3$	$3,3 \pm 0,9$	$1,8 \pm 1,0$	$2,3 \pm 1,2$
Significantie p		90%	37%	30%	34%

Tabel 6.2.: Analyse van de DNA verdelingen in procenten in laesies en niet aangetaste huid van personen met lichen ruber planus met behulp van de t-test.

6.3.3. MORBUS DARIER.

Bij M. Darier bestaan wat betreft de 2c, S en G_2M fractie alsmede wat betreft de ratio S/G_2M geen significante verschillen tussen laesie en normaal uitziende huid bij deze

aandoening (tabel 6.3.).

Tabel 6.3.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Laesie	8	93,4 ± 1,3	4,3 ± 1,2	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,6
Niet aange- taste huid	3	95,4 ± 1,7	2,9 ± 1,0	1,8 ± 0,7	1,7 ± 0,3
Significantie	p	7%	10%	13%	41%

Tabel 6.3.: Analyse van de DNA verdelingen in procenten in laesies en niet aangetaste huid van personen met M. Darier met behulp van de t-test.

6.3.4. NORMALE EPIDERMIS VERSUS NIET AANGETASTE EPIDERMIS VAN NEURODERMITIS, LICHEN RUBER PLANUS EN M. DARIER.

Bij vergelijking van de verdeling van het DNA gehalte in de epidermiscellen afkomstig uit de niet aangetaste huid van personen met neurodermitis, resp. lichen ruber, resp. M. Darier met de DNA verdeling in normale huid van controle personen komen geen significante verschillen naar voren (tabel 6.4.).

Tabel 6.4.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Normale epid.	60	95,9 ± 1,1	2,8 ± 0,8	1,3 ± 0,6	2,6 ± 1,1
Neurodermitis	10	95,8 ± 0,9	2,8 ± 0,7	1,5 ± 0,4	1,9 ± 0,4
Significantie	p	8%	82%	51%	6%
Lichen ruber	7	94,9 ± 1,3	3,3 ± 0,9	1,8 ± 1,0	2,3 ± 1,2
Significantie	p	11%	24%	7%	42%
M. Darier	3	95,4 ± 1,7	2,9 ± 1,0	1,8 ± 0,7	1,7 ± 0,3
Significantie	p	59%	97%	26%	12%

Tabel 6.4.: Vergelijking van de DNA verdelingen in procenten van epidermiscellen uit de niet aangetaste huid van personen met resp. neurodermitis, lichen ruber planus en M. Darier met de DNA verdeling in de normale huid van controle personen.

6.3.5. NORMALE EPIDERMIS VERSUS LAESIE VAN NEURODERMITIS, LICHEN RUBER PLANUS EN M. DARIER.

Er bestaan significante verschillen voor wat betreft de hier onderzochte parameters tussen neurodermitis-laesies en de normale epidermis. Bij lichen ruber zijn deze verschillen niet aanwezig. Bij M. Darier zijn de verschillen juist significant voor de 2c, S en G₂M fractie. De ratio S/G₂M is niet verschillend. Zoals reeds eerder is vermeld zijn er uitgesproken significante verschillen in DNA verdeling tussen psoriasislaesies en normale epidermis (tabel 6.5.).

Tabel 6.5.

	n	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
Normale epi-dermis	60	95,9 ± 1,1	2,8 ± 0,8	1,3 ± 0,6	2,6 ± 1,1
Neurodermitis	18	91,3 ± 3,1	6,1 ± 1,6	2,5 ± 1,9	3,9 ± 4,1
Signif. p		0,1%	0,1%	0,1%	2,2%
Lichen ruber	6	94,9 ± 0,6	3,7 ± 0,4	1,4 ± 0,3	2,8 ± 0,5
Signif. p		43%	30%	90%	81%
M. Darier	8	93,4 ± 1,3	4,3 ± 1,2	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,6
Signif. p		2%	4,2%	4,4%	44%
Psoriasis	94	87,3 ± 3,4	9,7 ± 2,6	2,9 ± 1,4	4,1 ± 2,2
Signif. p		0,1%	0,1%	0,1%	0,1%

Tabel 6.5.: Vergelijking van de DNA verdeling in normale huid van controle personen met de DNA verdeling in epidermale celsuspensies afkomstig uit laesies van resp. neurodermitis, lichen ruber, M. Darier en psoriasis.

6.3.6. PSORIASIS VULGARIS VERSUS NEURODERMITIS; LICHEN RUBER PLANUS EN M. DARIER.

Bij vergelijking van de DNA verdeling van epidermiscellen uit laesies van bovengenoemde drie huidafwijkingen met psoriasis vulgaris laesies komen in de 2c en S fractie significante verschillen naar voren. De G₂M fractie is alleen bij lichen ruber significant verschillend van psoriasis.

De ratio S/G_2M is alleen significant verschillend voor M. Darier (tabel 6.6.).

Tabel 6.6.

	n	2c	S	G_2M	S/G_2M
Psoriasis	94	$87,4 \pm 3,4$	$9,7 \pm 2,6$	$2,9 \pm 1,4$	$4,1 \pm 2,2$
Neurodermitis	18	$91,3 \pm 3,1$	$6,1 \pm 1,6$	$2,5 \pm 1,9$	$3,9 \pm 4,1$
signif. p		0,1%	0,1%	20%	70%
Lichen ruber	6	$94,9 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,5$
Signif. p		0,1%	0,1%	0,3%	15%
M. Darier	8	$93,4 \pm 1,3$	$4,3 \pm 1,2$	$2,2 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,6$
Signif. p		0,1%	0,1%	13%	0,7%

Tabel 6.6.: Vergelijking van de DNA verdeling in procenten in psoriasis vulgaris laesies met de DNA verdelingen in epidermale celsuspensies afkomstig uit resp. neurodermitis, lichen ruber en M. Darier laesies.

6.4. DISCUSSIE.

Epidermale cellen in neurodermitis laesies verschillen significant in DNA distributie van normale epidermiscellen. Het aantal cellen in de S fase van de celcyclus is duidelijk verhoogd vergeleken met de niet aangedane huid bij deze aandoening (tabel 6.1.) en met de normale huid van controle personen (tabel 6.5.). Het percentage S is bij neurodermitis significant lager dan dat van psoriasislaesies (tabel 6.6.). Neurodermitis laesies zijn derhalve met de flowcytometer op grond van het afwijkende percentage cellen met een DNA gehalte van de kern tussen 2c en 4c te differentiëren van normale epidermis en van psoriasis vulgaris.

In de ons bekende literatuur hebben we geen gegevens over de mate van proliferatie van de epidermis bij neurodermitis gevonden. Over de betekenis van het hogere percentage S bij neurodermitis kan geen zekere uitspraak worden gedaan. Uit het veranderen van de ratio S/G_2M kan men wel concluderen dat bij neurodermitis, evenals dit het geval is bij psoriasis, veranderingen in de celcyclus optreden t.o.v. normale epidermis.

De niet aangedane huid en de laesies bij neurodermitis ver-

schillen significant voor wat betreft de 2c en S fractie (tabel 6.1.). De G_2M fractie en de ratio S/G_2M zijn in deze metingen niet significant verschillend ofschoon er in de berekende waarden schijnbaar grote verschillen zijn. Dit berust op de grote standaarddeviatie in de S en G_2M fractie. Bij zowel psoriasis als neurodermitis is er, zij het in uiteenlopende mate, een toename van het aantal DNA synthetiserende cellen. De ratio S/G_2M verschilt bij deze aandoeningen niet. In theorie is de mogelijkheid aanwezig dat bij beide aandoeningen een, verschillend grote, toename van de groeifractie bestaat. Voor psoriasis is een dergelijke toename aangetoond (Chopra & Flaxman, 1974). Ook een verkorting van de totale celcyclus tijd geeft een toename van het percentage S bij gelijkblijvende ratio.

Het aantal DNA synthetiserende cellen in lichen ruber laesies is in onze metingen niet significant hoger dan in de niet aangedane huid bij deze aandoening (tabel 6.2.) of in de normale huid van controle personen (tabel 6.5.). Deze bevinding stemt overeen met de studie van Walker & Dolby (1974), die geen verschil in labelling index tussen lichen ruber laesies en normale huid van controle personen vinden. Daarentegen is de proliferatie volgens Lever (1967) en volgens Pinkus & Mehregan (1969) verlaagd in lichen ruber laesies. Op hun beurt vinden Marks et al. (1973) en Ebner et al. (1977) een verhoging van de L.I. zowel in de laesie als in de normaal uitziende huid van lichen ruber vergeleken met de epidermis van controle personen. Onze metingen suggereren dat de mogelijke storing in het verhoorningsproces bij lichen ruber niet moet worden gezocht in de richting van een toegenomen proliferatie. Het door Marks et al. (1973) en Presbury & Marks (1974) voorgestelde concept dat bij lichen ruber een repopulatie van de beschadigde basale cellen door keratinocyten uit de rand van de laesie plaatsvindt, is hiermee niet in tegenspraak. Lichen ruber laesies en psoriasislaesies verschillen significant in aantal DNA synthetiserende cellen.

Epidermiscellen afkomstig uit laesies van M. Darier hebben een DNA verdeling van de kern die wat betreft de S en G_2M fractie niet significant verschilt van die van normale huid van controle personen (tabel 6.5.). Tussen laesie en klinisch niet aangetaste huid bij deze aandoening bestaan geen significante verschillen in DNA verdeling (tabel 6.3.). De klinisch normaal uitziende huid bij M. Darier verschilt in de hier gemeten parameters niet van normale huid. Deze schijnbare tegenspraak berust mogelijk op het kleine aantal gemeten proefpersonen. Tussen M. Darier en psoriasislaesie zijn er significante verschillen in aantal DNA synthetiserende cellen.

De niet aangedane huid van de 3 besproken huidaandoeningen verschilt niet wat de hier gemeten parameters betreft van

normale huid van controle personen. De normaal uitziende huid van personen met psoriasis is daarentegen wel significant verschillend van normale epidermis. Deze discrepantie vormt een aanwijzing dat er een verschil in aetiologie tussen psoriasis en neurodermitis kan bestaan. Mogelijk is de storing in de regulatie van de groei bij psoriasis centraal gelocaliseerd, waardoor de gehele epidermis reeds een veranderd proliferatiepatroon heeft, waarbij door aspecifieke stimuli klinisch manifeste psoriasislaesies kunnen ontstaan. Bij neurodermitis, waarbij eveneens een toename van de proliferatie, zij het in geringere mate dan bij psoriasis, blijkt te bestaan, bestaat mogelijk een lokale storing in de groeiregulatie, waarbij de regulatie in de niet aangedane epidermis normaal blijft.

De doelstelling van dit hoofdstuk is de beantwoording van de vraag of de afwijkende DNA verdeling in de kernen van de epidermiscellen bij psoriasis specifiek is voor deze aandoening. Aan de hand van de verkregen meetresultaten blijkt dat psoriasiscellen inderdaad flowcytometrisch kunnen worden gedifferentiëerd van epidermiscellen afkomstig van een aantal andere huidaandoeningen die eveneens op een mogelijke storing in het verhoorningsproces berusten.

6.5. REFERENTIES.

Chopra, D.P. & Flaxman, B.A.: Comparative proliferative kinetics of cells from normal human epidermis and benign epidermal hyperplasia (psoriasis) in vitro. *Cell Tissue Kinet.*, 7:69-76, 1974.

Ebner, H., Gebhart, W., Lassmann, H. & Jurecka, W.: The epidermal cell proliferation in lichen planus. *Acta Dermatoven.*, 57:133-136, 1977.

Lever, W.F.: *Histopathology of the skin*. 4th edn, pag.157, J.B. Lippincott, Philadelphia.

Marks, R., Black, M. & Wilson Jones, E.: Epidermal cell kinetics in lichen planus. *Br. J. Derm.*, 88:37-45, 1973.

Nie, N.H.: *Statistical Package for the Social Sciences*. McGraw-Hill, London, 1975.

Pinkus, H. & Mehregan, A.H.: *A guide to Dermatohistopathology*, pag 123, Butterworths, London, 1969.

Presbury, D.G.C. & Marks, R.: The epidermal disorder in lichen planus: an in vitro study. *Br. J. Derm.*, 90:373-380, 1974.

U.R.C. (Universitair Reken Centrum), Nijmegen, Release 7.02 on I.B.M. 370/158, 1979.

Walker, D.M. & Dolby, A.E.: Labelling index in the mucosal lesions of lichen planus. *Br. J. Derm.*, 91:549-556, 1974.

HOOFDSTUK 7.

FLOWCYTOMETRISCHE BEPALING VAN DE THERAPIE-EFFECTEN VAN EEN AANTAL VEEL TOEGEPASTE THERAPIEREGIMES BIJ PSORIASIS VUL- GARIS.

- 7.1. Inleiding
- 7.2. Dithranol
 - 7.2.1. Inleiding
 - 7.2.2. Materiaal en methode
 - 7.2.3. Resultaten
 - 7.2.4. Discussie
- 7.3. Photochemotherapie
 - 7.3.1. Inleiding
 - 7.3.2. Goeckerman therapie.
 - 7.3.2.1. Inleiding
 - 7.3.2.2. Materiaal en methode
 - 7.3.2.3. Resultaten
 - 7.3.2.4. Discussie
 - 7.3.3. P.U.V.A.
 - 7.3.3.1. Inleiding
 - 7.3.3.2. Materiaal en methode
 - 7.3.3.3. Resultaten
 - 7.3.3.4. Discussie
- 7.4. Röntgen therapie
 - 7.4.1. Inleiding
 - 7.4.2. Materiaal en methode
 - 7.4.3. Resultaten
 - 7.4.4. Discussie
- 7.5. Referenties

FLOWCYTOMETRISCHE BEPALING VAN DE THERAPIE-EFFECTEN VAN EEN AANTAL VEEL TOEGEPASTE THERAPIEREGIMES BIJ PSORIASIS VULGARIS

7.1. INLEIDING.

De behandeling van psoriasis is nog steeds voor een belangrijk deel gebaseerd op empirie. Deze therapie bestaat uit applicatie van lokale agentia, soms in combinatie met systemische chemotherapeutica. Het aangrijpingspunt en werkingsmechanisme van deze medicamenten op celkinetisch niveau is vaak nog in duisternis gehuld. Ook de rationele achtergrond van het combineren van de diverse therapeutische mogelijkheden ontbreekt nog.

Flowcytometrisch onderzoek van een epidermale celsuspensie maakt het mogelijk binnen korte tijd het aantal cellen in de S en G₂M fase te bepalen. Het proliferatiepatroon van de epidermiscellen uit een psoriasislaesie verschilt significant van dat van klinisch niet aangetaste epidermiscellen (cf. hoofdstuk 5). Nadat een psoriasislaesie onder invloed van therapie is verdwenen is er in de DNA histogrammen geen onderscheid meer tussen de epidermiscellen van de plaats van de voormalige laesie en van de overige niet aangetaste epidermiscellen.

Het lijkt zinvol de veranderingen in proliferatieactiviteit die tijdens de therapeutisch geïnduceerde genezing van een psoriasisplek optreden met behulp van de flowcytometer te volgen. In dit hoofdstuk worden de flowcytometrische bevindingen tijdens dithranol (cignoline^R) applicatie, teerbadd-hoogtezon behandeling, PUVA therapie en röntgenbestraling weergegeven.

7.2. DITHRANOL (CIGNOLINE^R).

7.2.1. INLEIDING.

De monografie van de Engelse dermatoloog Balmanno Squire in 1878 over ruw chrysarobine gaf de beslissende impuls voor de invoering van goa-poeder in de westerse geneeskunst en zijn toepassing als therapie van in het bijzonder psoriasis maar ook van lichen ruber, acne, rosacea, pityriasis versicolor en andere chronische dermatosen (Weirich & Kett-lewell, 1972). Dithranol (1,8 dihydroxy-anthranol = anthraline = cignoline^R) is door Unna en Galewsky in 1916 geïntroduceerd als substituut voor chrysarobine, dat inconstant in samenstelling, wisselvallig in anti-psoriatisch effect en veranderlijk in chemische stabiliteit is. In 1953 pu-

bliceerde Ingram (1953,1954) de methode om dithranol in de stijve pasta Lassar te appliceren in combinatie met teer en u.v. straling. Comaish (1965,1971) modificeerde het Ingram regime door oplopende concentraties dithranol te appliceren. Kortdurende applicatie van hoge concentraties dithranol is de laatste ontwikkeling op het gebied van psoriasis behandeling met dithranol (Schaefer et al.,1980).

Dithranol dringt snel de levende epidermis binnen en wordt in het stratum spinosum geoxydeerd (Kammerau et al.,1975; Selim et al.,1981). De intrinsieke instabiliteit van het anthraline molecuul, die leidt tot het ontstaan van meerdere derivaten, bemoeilijkt het onderzoek naar het werkingsmechanisme op moleculair niveau aanzienlijk. Dithranol heeft meerdere effecten op de epidermis.

Dithranol vormt complexen met DNA (Swanbeck & Thyresson, 1965; Swanbeck & Zetterberg,1971). De ligging van dithranol tussen elke achtste basenpaar in leidt tot verstoring van de matrix en zo tot stilstand van de DNA replicatie. In tegenstelling tot de klinische ervaring zou dithranol in lage concentraties carcinogeen zijn (Segal et al.,1971; Zetterberg & Swanbeck,1971). Complexvorming met RNA is omstreken (Weigand & Everett,1967). Het vermogen van de cellen om aminozuren te incorporeren in eiwitten wordt door dithranol niet aangetast; wel wordt de thymidine inbouw in DNA in met de tijd toenemende mate geremd (Klem,1978).

Tevens leidt dithranol in therapeutische concentraties tot enzyminhibitie. De enzymactiviteiten van de pentose-fosfaat shunt (glucose-6-fosfaat dehydrogenase) en van de anaerobe glycolyse (glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase, lactico-dehydrogenase) worden het sterkst geremd. Andere enzymesystemen (ademhalingsketen, hydrolyse, citroenzuur cyclus) worden niet of slechts in geringe mate geremd (Meiers et al.,1968; Raab,1969; Braun-Falco et al.,1971; Rassner,1971; Cotton & v Rossum,1975). De inhibitiepercentages verschillen sterk, afhankelijk van de methode van bepaling. In psoriasis-cellen is de activiteit van de enzymen van de glycolyse met een factor 2 en van de enzymen, die betrokken zijn bij de pentose-fosfaat shunt, met een factor 4 verhoogd. In een therapeutische concentratie kan dithranol de activiteit van glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase in de epidermis in 6 dagen tot normale waarden en de activiteit van G-6-PD tot bijna normale waarden terugbrengen. Het is nog niet geheel duidelijk of dithranol een direct effect op deze enzymen heeft of indirect door reactie met co-enzymen aangrijpt.

Dithranol wordt in de epidermis geoxydeerd (Lehmann,1965). De auto-oxydatie van dithranol verloopt via meerdere vrije radicalen en leidt tot zeer reactieve dithranol radicalen en univalente reductieproducten van zuurstof. Volgens som-

mige auteurs zouden destructieve radicaal reacties verantwoordelijk zijn voor het therapeutisch effect (Mustakallio, 1981; Martinmaa et al., 1981).

7.2.2. MATERIAAL EN METHODE.

Van 11 personen met psoriasis vulgaris, die klinisch behandeld werden met cignoline pasta (cignoline, vaste paraffine 1,25%, vloeibare paraffine 1,25%, pasta Lassar) te beginnen met 0,05% en overeenkomstig het klinisch beeld opklimmend tot 3% cignoline, werden meerdere malen per week huidmonsters afgenomen. De monsters zijn alle uit dezelfde psoriasislaesie genomen, omdat tussen twee psoriasis plaques aanzienlijke verschillen kunnen bestaan (Cox & Watson, 1972; cf. hoofdstuk 5). Tevens zijn gelijktijdig huidmonsters genomen uit de klinisch niet aangetaste, niet behandelde huid. De patienten werden dagelijks met bovengenoemde pasta behandeld. Geen van de patienten ontving een andere locale of systemische therapie.

Afname en bewerking van de huidmonsters en meting en analyse van de celsuspensies geschiedde als beschreven in hoofdstuk 3.

7.2.3. RESULTATEN.

Bij alle onderzochte patienten treedt in de DNA histogrammen in de loop van de behandeling een asymmetrie van de 2c piek op (fig. 7.2.1.). Deze asymmetrie wordt niet gevonden in de niet behandelde, klinisch normaal uitziende huid. Bij continueren van de therapie verdwijnt de asymmetrie weer. De berekende percentages voor de S fractie dalen in de loop van de tijd, redelijk in overeenstemming met het verschijnen van de klinische verbetering. Uiteindelijk worden, wanneer de behandelde psoriasis plek klinisch geheel is genormaliseerd, waarden voor de S fractie gevonden die liggen in het spreidingsgebied van de klinisch normale huid van psoriasis patienten.

De G_2M waarden vertonen tijdens de dithranol behandeling geen extravagante reactie. Bij een aantal van de onderzochte personen treedt een geleidelijke daling van het aantal tetraploide cellen in de DNA histogrammen op tot het niveau van de klinisch niet aangetaste epidermis. Tabel 7.2.1. toont de in het verloop van de behandeling gevonden percentages voor de 2c, S en G_2M fractie van een met dithranol behandelde psoriasis plek.

Figuur 7.2.1. toont een voorbeeld van de voorbijgaande asymmetrie van de 2c piek in de DNA histogrammen van celsuspensies afkomstig uit met dithranol behandelde psoriasislaesies.

Fig. 7.2.1.

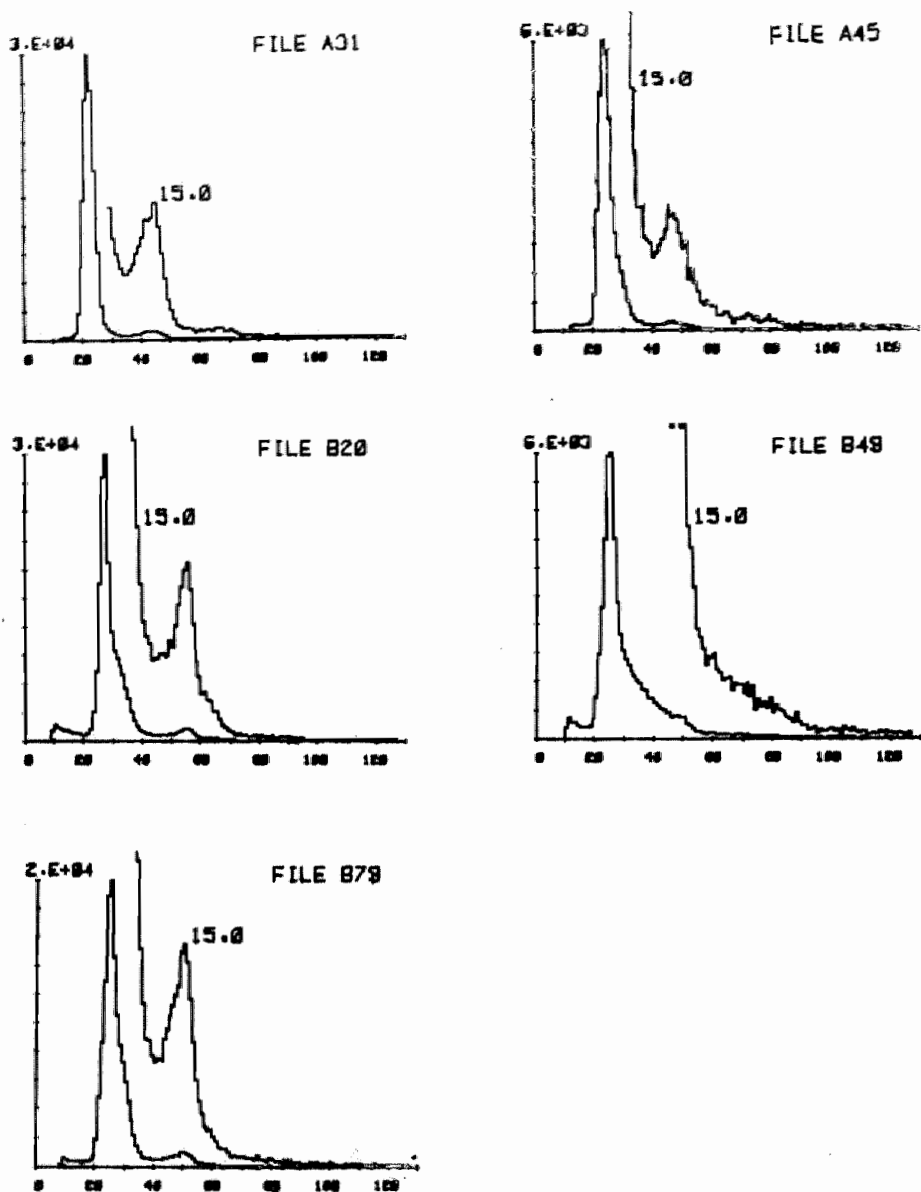


Fig. 7.2.1.: Voorbeeld van de voorbijgaande asymmetrie van de 2c piek in de DNA histogrammen van celsuspensies afkomstig uit met dithranol behandelde psoriasislaesies..

Tabel 7.2.1.

T	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
0	84,7	11,6	3,7	3,1
3	86,6	10,5	2,9	3,6
4	90,1	7,1	2,8	2,5
5	86,3	10,3	3,4	3,0
6	88,7	8,9	2,4	3,7
9	87,3	9,6	3,0	3,2
10	91,8	5,5	2,7	2,0
11	91,4	7,0	1,6	4,4
12	93,0	5,4	1,6	3,4
15	93,3	4,9	1,8	2,7
18	94,2	4,0	1,8	2,2

Tabel 7.2.1.: Overzicht van de gemeten percentages epidermiscellen in de 2c, S en G₂M fase in de DNA histogrammen, alsmede de ratio S/G₂M, van een persoon met psoriasis vulgaris na behandeling met locale dithranol applicatie. T = tijd in dagen na aanvang van de dithranol therapie.

7.2.4. DISCUSSIE.

Het mechanisme waarmee dithranol zijn therapeutisch effect op psoriasis-cellen uitoefent is op diverse wijzen in de afgelopen jaren bestudeerd.

Een daling van de mitotische index na dithranol therapie is meermalen beschreven (Krebs & Schaltegger, 1969; Fry & McMinn, 1968; Baxter & Stoughton, 1970; Fry et al., 1974).

Fisher & Maibach (1971) vinden daarentegen een stijging van de mitotische index na dithranol applicatie.

Steigleder et al. (1973) vinden een normalisatie van de verkorte celcyclustijd en een daling van de labelling index.

Deze daling in aantal DNA synthetiserende cellen wordt niet gevonden door Born (1969). Pullmann et al. (1981) vinden, na een aanvankelijke toename van de L.I. in een met dithranol behandelde psoriasislaesie, een daling van de L.I. in de daaropvolgende dagen en weken.

Ook over de invloed van dithranol op de duur van de synthese-fase heersen uiteenlopende opvattingen. Steigleder et al. (1973) vinden dat de Ts onder invloed van dithranol korter wordt, terwijl Fisher & Maibach (1975) een verlenging van deze tijd vinden. Deze tegenstrijdigheden, die weliswaar inherent zijn aan de opvattingen van de diverse auteurs over

de verschillen in duur van de celcyclus en zijn deelfasen tussen psoriasis en normale epidermis, onderstrepen het gebrek aan kennis van het werkingsmechanisme van dithranol. In de ons bekende literatuur hebben we geen onderzoeken met behulp van de flowcytometer naar de therapie-effecten van dithranol kunnen vinden.

Voor de bestudering van het effect van dithranol op het proliferatiepatroon van psoriasiscellen is de methode, waarbij cignoline dagelijks wordt geapliceerd, gekozen boven een éénmalige lokale toediening. Bij autoradiografisch onderzoek is gebleken dat na een éénmalige applicatie van dithranol zeer uiteenlopende en tegenstrijdige waarnemingen werden gedaan (Liden & Michaësson, 1974). Bij het benadrukken van het fundamentele aspect van het onderzoek naar de therapie-effecten van dithranol zou het juist geweest zijn de eventuele effecten van een éénmalige toediening te bestuderen. De moeilijkheid daarbij is of DNA het enige aangrijpingspunt van dithranol is. In dit onderzoek is gekozen voor de pragmatische kant van het onderzoek door het effect van dagelijkse applicaties van dithranol na te gaan. Dithranol vormt complexen met DNA leidend tot de inhibitie van de DNA synthese. Het is derhalve te verwachten dat dit zal reflecteren in de parameters die met de flowcytometer worden onderzocht.

Na dagelijkse applicatie van stijgende doses dithranol verschijnt na verloop van tijd in de DNA histogrammen een asymmetrie van de 2c piek. Het tijdsinterval tussen aanvang van de therapie en het optreden van deze asymmetrie, alsook de mate van asymmetrie, is individueel bepaald. Wel is er een relatie tussen het optreden van deze vormverandering en het begin van de klinische verbetering. Wanneer de klinische verbetering doorzet verdwijnt de asymmetrie geleidelijk.

Asymmetrie van de 2c piek betekent een toename van het aantal cellen dat geregistreerd wordt met een hoeveelheid DNA zoals normaliter cellen in de vroege S fase hebben. Deze schouder in de 2c piek kan reëel zijn, d.w.z. er is een toename van cellen in de vroege S fase, of kan een artefact zijn.

Indien de asymmetrie een gevolg is van een ophoping in de vroege S fase zijn hiervoor in theorie meerder oorzaken denkbaar. De ophoping kan een gevolg zijn van een synchronisatiegolf. Deze golf moet kunnen worden teruggevonden wanneer ze de celcyclus verder doorloopt. Daar dit in de histogrammen niet gebeurt is deze mogelijkheid hier uitgesloten. Ofschoon dithranol de groei van het epitheel irreversibel remt (Klem, 1978), treedt er toch geen totale blokkade op in de vroege S fase. Immers in dat geval moeten de celcycluscompartimenten achter de blokkade op korte termijn leeglopen. In aanvullend gemaakte DNA histogrammen is echter gebleken dat dit niet geschiedt. Een irreversibele blokkade van een deel van de prolifererende cellen geeft histogrammen zoals na toediening van dithranol worden gevonden. Deze mogelijkheid is niet met zekerheid uit te sluiten. Het feit

dat de asymmetrie verdwijnt bij het voortschrijden van de klinische verbetering is niet in tegenspraak met de mogelijkheid dat dithranol een deel van de prolifererende cellen irreversibel blokkeert in de vroege S fase. De DNA-dithranol complexen leiden tot stilstand van de DNA replicatie, waardoor de betrokken cellen irreversibel in hun verdere proliferatie worden geremd. Op histologische gronden is het aannemelijk dat deze irreversibel beschadigde cellen door lysis of migratie naar het huidoppervlak verdwijnen. Nadat deze cellen het levend epitheel hebben verlaten neemt de 2c piek in de histogrammen weer de normale vorm aan.

Indien de asymmetrische schouder van de 2c piek op een artefact berust zijn ook in dit geval meerdere mogelijke oorzaken denkbaar. De aanwezigheid van infiltraatcellen, die, ofschoon ze diploid zijn, andere kleureigenschappen hebben dan keratinocyten, kan een dergelijke asymmetrie veroorzaken. Dit is onwaarschijnlijk omdat bij histologisch onderzoek geen infiltraat in de epidermis wordt gezien na dithranol applicaties.

Een andere mogelijkheid is dat onder invloed van de dithranol therapie een aantal keratinocyten een afwijkende kleuringskarakteristiek krijgen. In dat geval neigt de DNA distributie tot verbreding. Uit piek-area experimenten is gebleken dat deze afwijkende populatie in de volgens de hier gebruikte wijze verkregen histogrammen grotendeels terecht komt in het gebied van de vroege S fase.

Ook het ontstaan van cellen met een stabiel RNA, dat niet afbreekt met het hier gebruikte RNA-ase, kan artefacten geven waarbij asymmetrie van de 2c piek ontstaat. Mogelijk dat toepassing van diverse soorten RNA-ase hierin inzicht kan verschaffen.

Bij het uitvergroten van de 4c piek blijkt dat ook hier een asymmetrie naar de hogere kanaalnummers voorkomt. Deze verbreding kan gezien worden als klontjes van twee cellen met deze afwijkende kleureigenschap. Deze bevinding doet ons ertoe neigen een voorkeur uit te spreken voor de mogelijkheid dat onder invloed van dithranol applicaties op de psoriasislaesie een subpopulatie van keratinocyten ontstaat die een afwijkende kleuringskarakteristiek hebben. Wanneer deze cellen tijdens de verdere behandeling verdwijnen door lysis of migratie uit de prolifererende pool her krijgen de histogrammen hun normale vorm.

Het percentage cellen in de G_2M fase van de celcyclus wordt volgens onze metingen niet bij alle patiënten beïnvloed door de dithranol therapie. Bij een aantal personen daalt het aantal tetraploide cellen tot het niveau van de klinisch niet aangetaste epidermis. Vele auteurs vinden in histologische coupes een daling van het aantal mitosefiguren na dithranol applicatie. Op grond hiervan zou een geringe daling van de G_2M te verwachten zijn. Mogelijk wordt de daling

in mitose aantal gecompenseerd door verlenging van de duur van de G₂ fase, zoals deze met behulp van FLM curves door Fisher & Maibach (1975) na dithranol therapie is gevonden.

Op grond van de gevonden histogrammen is het aannemelijk dat dithranol een deel van de prolifererende psoriasiscellen uit de prolifererende populatie doet verdwijnen, waarna deze cellen uit het levend epitheel verwijnen.

7.3. FOTOCHEMOTHERAPIE.

7.3.1. INLEIDING.

Het gunstige therapeutische effect van zonlicht op psoriasis is reeds lang bekend. Betere resultaten met ultra violet licht behandeling werden na 1925 verkregen toen Goeckerman de methode beschreef om de werking van u.v. licht te vergroten door de huid te fotosensibiliseren met koolteerzalf. Dit principe is ook met succes toegepast door gebruik te maken van tryptaflavine (Oppenheim, 1928) en sulfa (Tulipan, 1941; Epstein, 1947). Ook psoralenen zowel lokaal (Walter & Voorhees, 1973; Mortazawi & Oberste Lehn, 1973; Weber, 1974) als oraal (Parrish et al., 1974; Swanbeck et al., 1975; Wolff et al., 1975) in combinatie met langgolvig ultra violet licht blijken succesvol bij de behandeling van psoriasis.

In onderstaand capitulum worden met behulp van de flowcytometer de eventuele effecten van behandeling met teerbaden en hoogtezon en met PUVA op de DNA distributie in epidermiscellen uit normale huid en uit psoriasislaesies onderzocht.

7.3.2. GOECKERMAN THERAPIE.

7.3.2.1. INLEIDING.

De Goeckerman therapie, zoals deze bij dit onderzoek is toegepast, bestaat uit het nemen van een teerbad en vervolgens hoogtezon bestraling in stijgende dosering. Deze procedure wordt bij het gebruikelijke therapierégime in de kliniek gecombineerd door dagelijkse applicatie van dithranol pasta in stijgende concentraties (Ingram therapie). Deze combinatie therapie is nog steeds een van de meest succesvolle bij de behandeling van psoriasis. Daar dithranol, gezien de complicaties die kunnen optreden, alleen door ervaren personen kan worden geapplied, kan deze behandeling slechts intramuraal plaatsvinden. De gemiddelde opnameduur bedraagt dan ongeveer 4 weken. Behandeling volgens Goeckerman kan wel poliklinisch worden toegepast. De teerbad-hoogtezon behan-

deling wordt, teneinde een opname te voorkomen, frequent als adjuvans gebruikt in die gevallen waarbij de psoriasis resistent is tegen de gebruikelijke poliklinische behandelingswijze. Het therapeutisch resultaat van de teerbade-hoogtezon behandeling is wisselend. Als regel wordt de laesie slechts schilfervrij, waarbij nog vaak rode plaques op de huid blijven bestaan (LeVine et al., 1979).

Het effect van dithranol op de DNA verdeling in de behandelde epidermiscellen is reeds elders (7.2.) vermeld. Met het oog op een optimalisatie van de therapie lijkt het zinvol het effect op de celcyclus van teerbade-hoogtezon behandeling alleen en in combinatie met dithranol applicatie te onderzoeken.

3.2.2. MATERIAAL EN METHODE.

Bij zes patienten, die reeds jaren lijden aan psoriasis vulgaris, is één arm behandeld met teerbade-hoogtezon alleen. Op de overige laesies werd tevens dithranol in stijgende concentratie in pasta Lassar geapplianceerd. De behandeling bestond uit het nemen van een teerbade (100 ml liquor carbonis detergens in ongeveer 200 liter water) gedurende 20 minuten gevolgd door hoogtezon bestraling. De duur van deze bestraling bedroeg 1 minuut op de eerste dag; elke volgende dag stijgt de bestralingsduur met 1 minuut totdat een duur van 15 minuten is bereikt. De bestraling vond plaats met Westinghouse hoogtezonlampen (FS 40W Sunlamp). Deze lampen zenden voornamelijk u.v. B licht uit (emissiepiek bij 312 nm). De behandeling vond klinisch plaats. Geen van de patienten gebruikte medicatie van welke aard dan ook.

Dagelijks zijn monsters voor flowcytometrisch onderzoek afgenomen uit dezelfde psoriasis plaque op linker en rechter arm. De monsters van de klinisch niet aangetaste epidermis zijn genomen uit de arm die alleen Goeckerman therapie had ontvangen. Afname en bewerking van de monsters geschiedde gelijktijdig en onder gelijke condities. Meting van de celsuspensies en analyse van de histogrammen gebeurde op de wijze zoals beschreven in hoofdstuk 3.

3.2.3. RESULTATEN.

In de niet aangetaste epidermis treden tijdens de teerbade-hoogtezon behandeling geen veranderingen op in het percentage S. Het percentage G₂M stijgt bij enkele proefpersonen, terwijl bij anderen geen reactie wordt geregistreerd.

De psoriasislaesies die alleen met teerbade gevolgd door hoogtezon bestraling zijn behandeld vertonen in de loop van de behandeling geen tot een geringe daling van het percentage S. De G₂M fractie ondergaat geen duidelijke verandering. Er ontstaat geen asymmetrie van de 2c piek in tegenstelling tot de

laesies die aanvullend met dithranol zijn behandeld. De daling van het percentage S, die in de volgens Ingram behandelde laesies optreedt, is veel groter dan in de laesie die alleen teerbade en hoogtezon bestraling hebben ontvangen. Het percentage G₂M ondergaat ook tijdens de Ingram therapie slechts geringe verandering. Tabel 7.3.1. geeft de gevonden waarden weer voor één aldus behandelde persoon.

Tabel 7.3.1.

T	Niet aangetaste epidermis		Teerbade + Hoogtezon laesie		Ingram laesie	
	S	G ₂ M	S	G ₂ M	S	G ₂ M
0	4,3	1,8	8,2	3,0	8,4	2,9
1	4,1	1,7	8,7	3,2	8,0	3,0
2	4,4	2,0	8,6	2,6	9,0	2,8
3	4,4	1,9	7,8	2,7	7,4	2,5
4	3,8	1,6	8,6	3,1	7,6	2,8
5	4,0	2,1	8,8	3,2	-	-
7	4,2	1,9	7,8	2,9	7,0	3,0
8	4,0	1,7	7,9	2,8	7,3	2,7
9	4,2	2,0	8,0	3,2	6,4	2,8
10	-	-	-	-	6,0	2,7

Tabel 7.3.1.: Overzicht van de DNA verdelingen in procenten in het verloop van de tijd (T in dagen) na behandeling van niet aangetaste epidermis en psoriasislaesie met teerbade en hoogtezon bestraling en van psoriasislaesie behandeld volgens Ingram bij één persoon.

7.3.2.4. DISCUSSIE.

Ultraviolet bestraling in combinatie met koolteer voorbehandeling is een therapeutisch regime geweest gedurende vele jaren. Vele psoriasispatienten ervaren het nemen van een teerbade echter als een minder prettige ervaring. Hoogtezonbestraling van met teer gefotosensibiliseerde epidermiscellen uit een psoriasislaesie heeft geen grote veranderingen in de DNA verdeling in de epidermiscellen tot gevolg. Hiermee in overeenstemming is onze klinische ervaring

dat Goeckerman therapie de psoriasislaesie niet doet verdwijnen. De laesie wordt als regel slechts schilfervrij. Fischer (1976) vermeldt dat u.v. energie van 313 nm psoriasislaesies kan aanzetten tot genezing. LeVine et al. (1980) tonen daarentegen aan dat, ook indien de laesies klinisch zijn verdwenen, het extractiepatroon van de keratineproteïnen van de epidermis kenmerkend voor psoriasis blijft. Eveneens is er geen complete resolutie van de abnormale histologische en histochemische bevindingen zoals deze bij psoriasis worden gezien (Frank et al., 1964; Lawler & Vineyard, 1960).

De door Epstein et al. (1970) gevonden remming van de proliferatieactiviteit na Goeckerman therapie wordt door onze metingen niet bevestigd. Het waargenomen verdwijnen van de schilfers berust volgens onze metingen niet op een verminderde delingsactiviteit van de psoriasiscellen. Veeleer is het effect van deze therapie meer cosmetisch dan reëel.

Uit de histogrammen blijkt dat het celkinetisch effect pas optreedt wanneer dithranol aan de therapie wordt toegevoegd. Flowcytometisch zijn er duidelijke verschillen tussen behandeling met en zonder dithranol applicatie na Goeckerman therapie.

Klinisch ontstaat na een behandelingsduur van ongeveer een week bij de meeste patienten een duidelijk waarneembaar verschil tussen laesies die op deze beide manieren zijn behandeld. De gevonden verschillen in percentage S lopen parallel met de verschillen in klinisch beeld. Ook in deze proefnemingen bestaat een correlatie tussen het verschijnen van de asymmetrie van de 2c piek in de histogrammen van met dithranol behandelde laesies en het begin van de klinische verbetering van deze laesies.

Volgens Ingram (1953) biedt de combinatie van teer, u.v. licht en dithranol voordelen. Met deze methode bereikte Comaish (1965) bij klinisch behandelde psoriasispatienten bij een gemiddelde therapieduur van 15,2 dagen bij 95% van de patienten een volledig verdwijnen van de laesies. Welke rol dithranol en u.v. licht in deze behandelingsketen spelen is nog geenszins duidelijk. Er bestaan experimentele en klinische aanwijzingen dat u.v. licht het therapeutisch effect van dithranol kan verhogen (Dugois et al., 1975; Walter et al., 1978). Schauder & Mahrle (1982) kunnen daarentegen geen beter therapieresultaat voor deze combinatie-therapie aantonen.

Aan de therapeutische rol van teer in de combinatie met u.v. bestraling wordt door meerdere auteurs getwijfeld (LeVine & Parrish, 1980; Belsito & Kechjian, 1982). Schauder & Mahrle (1982) kunnen geen verbetering van de dithranolwerking op psoriasislaesies door u.v. B bestraling vaststellen. Dit stemt overeen met onze bevindingen.

Het percentage G₂M daalt tijdens de Ingram behandeling

nauwelijks, in tegenstelling tot de verwachting. Psoriasis-cellen die alleen met cignoline zijn behandeld vertonen deze daling tijdens de behandeling wel. Van belichting met u.v. B licht is bekend dat deze een toename van de G₂M fractie geeft (Mier et al., 1977). Het is mogelijk dat de bij de met de Ingram therapie geïnduceerde genezing verwachte daling wordt gecamoufleerd door deze toename van G₂M.

Het is de vraag of bij de behandeling met dithranol voorbehandeling met teerbad en hoogtezonbestraling noodzakelijk is. Aan de therapeutische rol van teer wordt door velen getwijfeld, terwijl Schauder & Mahrle (1982) geen verbetering van de dithranolwerking door u.v. B bestraling hebben kunnen aantonen. Zowel de histogrammen van psoriasiscellen afkomstig uit laesies die alleen met dithranol zijn behandeld (cf. 7.2.), alsook de histogrammen van psoriasiscellen die tevens teerbad en hoogtezonbestraling hebben ontvangen (totale Ingram behandeling) vertonen beide dezelfde trend wat betreft daling van het percentage S en asymmetrie van de 2c piek. De tijd die verloopt tussen aanvang van de therapie en het optreden van de voorbijgaande asymmetrie van de 2c piek is individueel bepaald. Derhalve dient bij het doen van een uitspraak over het al dan niet leveren van een bijdrage van de teerbad-hoogtezon component aan het therapeutisch succes en de snelheid waarmee dit succes optreedt voorzichtigheid te worden betracht gezien het feit dat hier slechts een gering aantal personen is onderzocht. De verkregen resultaten maken een uitgebreider klinisch en flowcytometrisch onderzoek naar deze vraagstelling gewenst, temeer daar recente publicaties een keerpunt in deze reeds tientallen jaren bestaande behandelingswijze lijken in te luiden, hetgeen zeker door vele patiënten als aangenaam zal worden ervaren.

7.3.3. PUVA.

7.3.3.1. INLEIDING.

Onder PUVA behandeling verstaat men de combinatie van een psoraleen preparaat (P) en bestraling met ultra violet A (UVA) licht (320-400 nm). Onder belichting met het lang golvige u.v. licht intercaleren de geëxciteerde furocoumarines met de pyrimidine basen van nucleïnezuren door hiermee een covalente binding aan te gaan (Musajo et al., 1967; Pathak & Kramer, 1969; Rodighiero et al., 1970). Deze fotochemische reactie leidt tot meerdere typen foto-producten, afhankelijk van het furocoumarine derivaat (Dall'Acqua et al., 1971). De moleculaire structuur van de diverse furocoumarine derivaten en de stereometrische relatie met de pyrimidine basen, wanneer zij geïntercaleerd worden in het DNA, zijn bepalend voor de mate waarin dwarsbruggen worden gevormd tussen de twee strands van de DNA dubbel helix (Cole, 1970; Dall'Acqua et al., 1971; Musajo & Rodighiero, 1972). Deze dwarsbruggen

kunnen met het elektronenmicroscop zichtbaar worden gemaakt en worden gekwantificeerd (Lerche et al., 1979).

De vorming van foto-adducten van psoraleen en pyrimidines leidt mogelijk tot inhibitie van de DNA synthese. Deze inhibitie van de epidermale DNA synthese is de rationele achtergrond voor het gebruik van psoralenen bij de behandeling van psoriasis (Parrish et al., 1974).

Het doel van dit onderzoek is met behulp van de flowcytometer na te gaan of en zo ja op welke wijze PUVA behandeling de epidermale celkinetiek bij psoriasis beïnvloedt.

1.3.2. MATERIAAL EN METHODE.

Het effect van een éénmalige PUVA behandeling op een normale epidermis is bepaald. Hiervoor werden twee personen zonder psoriasis, bij wie tevens de familieanamnese voor psoriasis negatief was, éénmalig bestraald met een hoeveelheid UVA licht (Waldmann 6000 PUVA apparaat), die in overeenstemming was met de minimale erytheem dosis (M.E.D.) twee uur na orale toediening van 8-Methoxypsoraleen (8-MOP). De hoeveelheid 8-MOP werd bepaald door het lichaamsgewicht van de proefpersonen.

Vervolgens zijn de veranderingen in de DNA distributie in de epidermiscellen tengevolge van PUVA therapie bepaald bij twaalf personen met een psoriasis palmaris. Deze onderzochte groep patienten, die op de polikliniek is gerecruteerd, is gedurende het gehele onderzoek klinisch behandeld. Veertien dagen voor en tijdens het gehele onderzoek hebben zij geen locale of systemische therapie van andere aard gekregen.

Het bij dit onderzoek gebruikte furocoumarine derivaat is het 8-Methoxypsoraleen (Meladinine^R, 30-50 mg per os, afhankelijk van het lichaamsgewicht). De lichtbestraling vond twee uur na de inname plaats. De UVA belichting geschiedde met een Waldmann 200 PUVA apparaat (emissie piek 365 nm). De begindosis van de bestraling was gelijk aan de minimale erytheem dosis, de verhoging van het aantal Joules/cm² was overeenkomstig de phototoxische pigmentatie index (P.P.I.). De psoriasislaesies werden viermaal per week behandeld. Dagelijks werden monsters uit laesie en normaal uitziende huid voor flowcytometrisch onderzoek afgenomen. Het afname-tijdstip was steeds 1 uur na de belichting.

Tevens is bij acht van de bovengenoemde psoriasispatienten het effect van 8-MOP alleen en 8-MOP in combinatie met UVA nagegaan voor de klinisch normale huid. Deze monsters werden afgenomen op een tijdstip dat de histogrammen van cellen uit de psoriasislaesies duidelijke veranderingen ver-

toonden.

Afname, bewerking en meten van monsters van dezelfde patient geschieden gelijktijdig en onder gelijke condities op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze.

Tenslotte zijn de eventuele verschillen in DNA distributies van celpopulaties afkomstig uit klinisch normale huid die de volle belichting met UVA had ontvangen en uit de klinisch normale huid die slechts zijdelings was "meebelicht" onderzocht. De verschillen in hoeveelheid opgestraald UVA licht tussen beide plaatsen op de huid konden met een belichtingsmeter goed zichtbaar worden gemaakt. Door de grote individuele verschillen in de volgens het behandelingsschema benodigde hoeveelheid UVA licht op grond van de sterk uiteenlopende P.P.I.'s, was het niet goed mogelijk deze verschillen te kwantificeren. Ook deze monsters zijn gelijktijdig afgenomen, bewerkt en gemeten op de in hoofdstuk drie beschreven wijze.

7.3.3.3. RESULTATEN.

Eénmalige PUVA behandeling van normale epidermiscellen.

Een éénmalige PUVA behandeling van een normale epidermis met een lichtdosis gelijk aan de M.E.D. geeft een stijging van de 4c piek te zien (tabel 7.3.2.).

Tabel 7.3.2.

I					II			
T	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M	2c	S	G ₂ M	S/G ₂ M
0	95,5	3,3	1,2	2,75	96,1	2,8	1,1	2,56
24	93,2	4,0	2,7	1,48	94,1	3,4	2,5	1,36
48	93,8	2,4	3,7	0,65	93,5	3,1	3,4	0,91
72	94,9	2,0	3,1	0,61	94,3	2,8	2,9	0,97
96	95,2	2,4	2,4	1,0	95,7	2,6	1,7	1,53

Tabel 7.3.2.: Overzicht van de analyses van de DNA verdelingen in normale epidermiscellen na een éénmalige PUVA behandeling met een dosis gelijk aan de M.E.D. bij twee gezonde proefpersonen in relatie tot de tijd (uren).

Klinisch niet aangetaste epidermis bij personen met psoriasis.

Bij 8 psoriasispatienten zijn, op een tijdstip dat de histogrammen van cellen uit met PUVA behandelde laesies duidelijke veranderingen vertoonden, de DNA verdeling in klinisch normaal uitziende epidermis bepaald. Bij allen blijkt 8-MOP alleen geen stijging van de G_2M fractie te geven. Deze stijging treedt pas op bij de combinatie 8-MOP en UVA licht. De ratio S/G_2M daalt diensgevolge aanmerkelijk. Tabel 7.3.3. geeft de gevonden waarden voor de ratio S/G_2M weer.

Tabel 7.3.3.

Pat no	8-MOP alleen	8-MOP + UVA
	Ratio S/G_2M	Ratio S/G_2M
1	2,69	0,88
2	3,07	0,77
3	3,15	0,98
4	2,88	1,31
5	3,73	1,0
6	4,40	0,98
7	2,67	1,61
8	1,59	0,90

Tabel 7.3.3.: Toont de ratio S/G_2M van klinisch niet aangetaste epidermis bij 8 psoriasispatienten die verscheidene malen 8-methoxypsoraleen alleen en 8-methoxypsoraleen in combinatie met UVA bestraling hebben ontvangen op een tijdstip dat de histogrammen van cellen uit de met PUVA behandelde psoriasislaesies duidelijke veranderingen vertoonden.

De stijging van de 4c piek geschiedt pas als de combinatie 8-MOP en UVA wordt toegepast. Tabel 7.3.4. geeft aan dat de mate van toename van de 4c piek is gerelateerd aan de dosis opvallend UVA licht.

Tabel 7.3.4.

	geen UVA			Partiële belichting			Volle belichting		
	S	G ₂ M	S/G ₂ M	S	G ₂ M	S/G ₂ M	S	G ₂ M	S/G ₂ M
1	3,9	1,8	2,17	4,5	2,7	1,67	4,4	4,0	1,10
2	3,6	1,2	3,00	4,2	2,8	1,50	5,4	4,9	1,10
3	3,6	1,7	3,82	3,8	2,3	1,22	5,3	4,3	1,23

Tabel 7.3.4.: Geeft de DNA distributie in de cellen uit klinisch normale epidermis van drie psoriasis-patienten die, in combinatie met 8-MOP, geen, resp. partiële, resp. volle UVA belichting hebben ontvangen.

Psoriasis.

Bij 10 van de 12 patienten met palmaire psoriasis treedt, na een individueel sterk wisselende tijd, variërend van enkele dagen tot twee weken, een zeer sterke stijging van het percentage G₂M op (fig. 7.3.1., tabel 7.3.5.). Het percentage G₂M kan stijgen tot boven de 20%. Ondanks het feit dat de PUVA therapie wordt gecontinueerd, zij het bij verbeteren van het klinisch beeld in een lagere frequentie, daalt het percentage G₂M weer (fig. 7.3.2.). Tegelijkertijd treedt in het algemeen een relatief geringe daling van het percentage S op. Dit percentage blijft langdurig, ook wanneer de behandelde psoriasisplek reeds lang weer klinisch normaal uitziet en de PUVA behandeling is gestopt, op een hoog niveau (fig. 7.3.3.). De ratio S/G₂M daalt, door de sterke stijging van G₂M, in een individueel sterk wisselend tijdsbestek.

Het klinisch resultaat is bij 10 patienten goed, d.w.z. dat de psoriasislaesie klinisch is verdwenen, bij twee patienten treedt echter snel een recidief op. Twee patienten reageerden noch klinisch, noch flowcytometrisch op de PUVA therapie (tabel 7.3.5.).

Tabel 7.3.5.

No	M/V	Leeftijd	Begin stij- ging G ₂ M	Begin kli- nisch effect	Klinisch eind- resultaat
1	M	52	2	2	goed
2	V	21	10	5	goed, snel rec.
3	M	50	geen	geen	geen effect
4	M	37	7	7	goed
5	M	47	6	10	erytheem rest
6	M	47	14	19	goed
7	M	67	geen	geen	geen effect
8	M	17	3	3	goed
9	V	57	13	12	goed
10	M	28	3	5	goed
11	V	31	10	9	goed
12	M	80	2	4	goed, snel rec.

Tabel 7.3.5.: Geeft voor de met PUVA behandelde patienten met palmaire psoriasis het eindresultaat van de behandeling weer, alsmede de tijdsinter- vallen in dagen tussen aanvang van de therapie en het begin van de stijging van de 4c piek en resp. het begin van het klinisch effect.

Fig. 7.3.1.

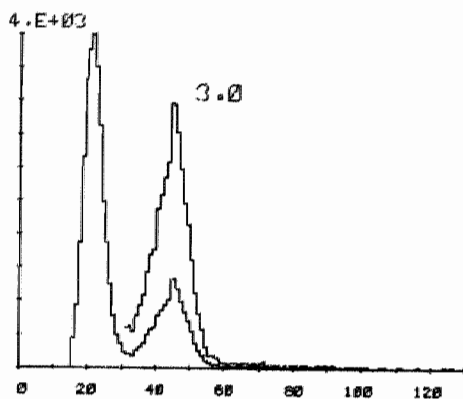


Fig. 7.3.1.: toont de zeer sterke toename van de 4c piek in het DNA histogram van cellen uit een psoriasislaesie die meermalen met PUVA is behandeld.

Fig. 7.3.2.

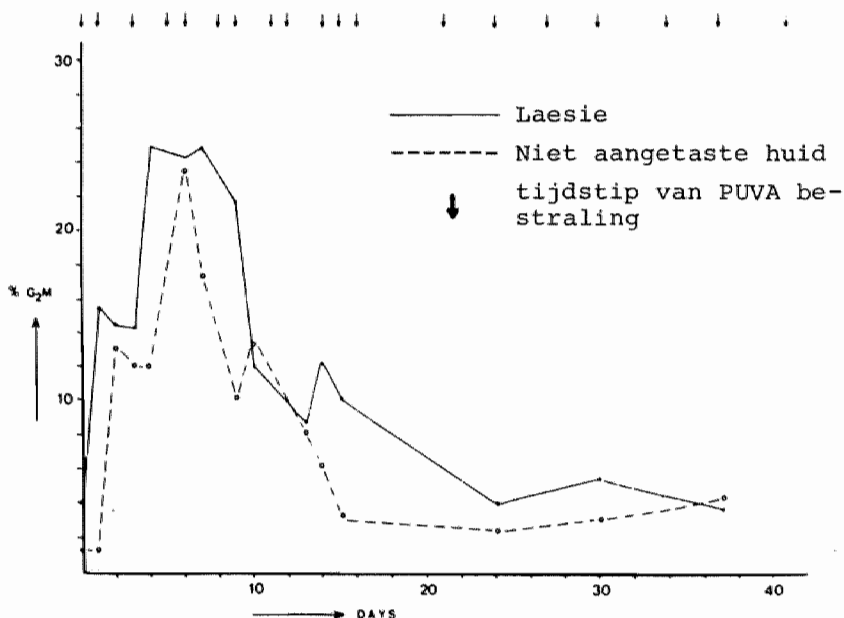


Fig. 7.3.2.: Toename en afname van het percentage G_2M in de DNA histogrammen van cellen uit psoriasislaesie en niet aangetaste epidermis na PUVA behandeling.

Fig. 7.3.3.

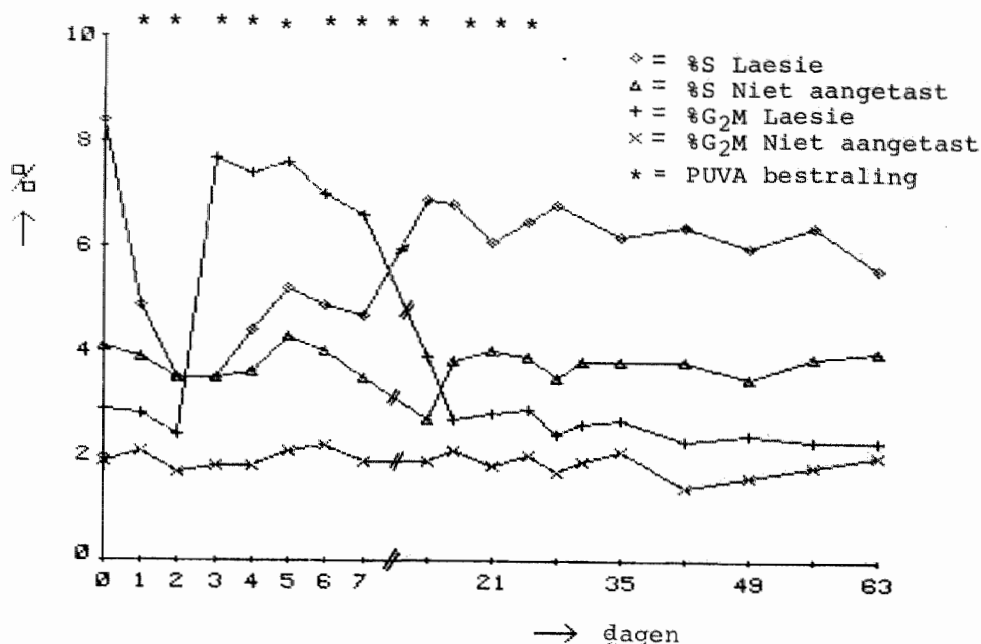


Fig. 7.3.3.: Overzicht van het verloop van de percentages S en G₂M in DNA histogrammen van celsuspensies uit met PUVA behandelde psoriasislaesies en uit klinisch niet aangetaste epidermis, die geen behandeling heeft gekregen, bij één psoriasis-patient in het verloop van de tijd.

3.3.4. DISCUSSIE.

Sinds Parrish et al. (1974) over de succesvolle behandeling van psoriasis met 8-MOP en UVA stralen berichtten, heeft PUVA therapie zich een belangrijke plaats verworven bij de behandeling van psoriasis (Wolff et al., 1981). PUVA behandeling heeft ondermeer inhibitie van de celproliferatie tot gevolg (Kenicer et al., 1981), waarbij momenteel nog niet met zekerheid bekend is of de inhibitie van de DNA synthese een direct gevolg van DNA beschadiging is of het resultaat van effecten in andere systemen (Bishop & Gray, 1981).

Uit de resultaten van de hier verrichte metingen kan worden geconcludeerd dat de flowcytometrische methode gevoelig genoeg is om subtiele veranderingen in DNA distributie tijdens de behandeling van de epidermis met PUVA te registreren. Bovendien geeft zij nieuwe informatie die autoradiografische

methoden niet bieden.

Een éénmalige PUVA behandeling van een normale epidermis geeft een voorbijgaande sterke stijging van de G_2M fractie. De S fractie lijkt kortdurend enige stijging te ondergaan. Ook klinisch niet aangetaste huid bij personen met psoriasis vertoont een stijging van de G_2M fractie. 8-MOP alleen geeft geen toename van de 4c piek. De mate van stijging van de 4c piek in de histogrammen van cellen uit klinisch normale huid lijkt bij de individuele patient afhankelijk van de hoeveelheid Joules/cm² die op de epidermis valt. Dit is in overeenstemming met de bevindingen van Krüger et al. (1978) dat de mate van fototoxiciteit voornamelijk afhankelijk is van de dosis UVA.

Na een individueel bepaalde tijd na aanvang van PUVA behandeling van psoriasiscellen treedt een zeer sterke stijging van de G_2M fractie op. Ondanks continueren van de PUVA therapie daalt het percentage G_2M vervolgens weer. De sterke toename van de G_2M fractie betekent een ophoping van cellen in de G_2 fase. Dat late S cellen een bijdrage aan de 4c piek leveren kan niet worden uitgesloten. De zich in de G_2 fase ophopende cellen zijn afkomstig uit de S fase. Omdat de S fase uiteindelijk niet leegloopt kan er geen sprake zijn van een totaal irreversibel blok in de G_2 fase. Wel kan de tijdelijke toename verklaard worden door het feit dat een deel van de prolifererende cellen irreversibel in de G_2 fase wordt geblokkeerd. De waargenomen daling van de G_2M piek wordt vervolgens veroorzaakt doordat de geblokkeerde cellen uit de populatie worden verwijderd door lysis of migratie naar het huidoppervlak. Het therapeutisch effect van de PUVA behandeling op de prolifererende celpopulatie in een psoriasisepidermis bestaat kennelijk uit eliminatie van een aantal cellen uit deze populatie en wel in de G_2 fase van de celcyclus. Ondanks het continueren van de PUVA behandelingen treedt na de daling van de G_2M fractie niet opnieuw een stijging op. De oorzaak hiervan is ons niet duidelijk. Mogelijk dat het repair mechanisme, dat door meerdere auteurs na PUVA behandeling is aangetoond (Lata et al., 1981; Honigsmann et al., 1981), door enzyminductie beter functioneert.

Het percentage S in de laesie daalt slechts langzaam en blijft ook in de klinisch weer normaal uitziende huid relatief hoog. Ook in de belichte niet aangetaste huid is dit percentage verhoogd. Het effect van PUVA behandeling van de prolifererende celpopulatie is wat de S fractie betreft soms nog tot 40 dagen na de laatste PUVA behandeling nog aantoonbaar.

Op grond van de optredende verbetering in klinisch beeld is een daling van het percentage S te verwachten. Deze daling treedt wel op, maar is vrij gering. Uit figuur 7.3.3. blijkt dat de ratio S/G_2M in de voormalige laesie groter is dan die

in de overige niet aangetaste epidermis. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de relatieve duur van de S fase langer wordt. Een verlenging van de S fase duur resulteert in de flowcytometrische metingen in een hoger percentage S.

Bij autoradiografisch onderzoek wordt een toename van de incorporatie van gemerkt thymidine in met PUVA behandelde monsters gevonden, welke wordt toegeschreven aan repair mechanismen in door PUVA beschadigd DNA (Epstein & Fukuyama, 1975; Lata et al., 1981). Met de flowcytometer worden deze herstelwerkzaamheden aan het DNA niet gemeten, daar de cellen waarin het DNA wordt hersteld een 2c hoeveelheid DNA blijven bevatten.

Over het verhoogde percentage S kan met behulp van de flowcytometer geen zekere uitspraak worden gedaan omdat bij deze methode de hoeveelheid DNA per cel wordt gemeten en niet de syntheseactiviteit.

De ophoping van cellen in de G_2 fase treedt blijkbaar pas op wanneer een individueel bepaalde drempel is overschreden. Ofschoon er een duidelijke correlatie is tussen de toename van het percentage G_2M in de histogrammen en de klinische verbetering, kan de doelstelling dat in het histogram van te voren de te verwachten klinische verbetering kan worden waargenomen en voorspeld, niet worden bereikt.

De laatste tijd bestaat er discussie of PUVA therapie rechtstreeks in de epidermis aangrijpt of via andere systemen werkt. De ophoping van cellen in de G_2 fase wijst op een directe beschadiging van de prolifererende keratinocyten door PUVA, hetgeen niet uitsluit dat PUVA ook aangrijpingspunten in andere systemen, b.v. het immunologische systeem heeft. Dit kan met de hier gebruikte methode niet worden opgehelderd.

7.4. RONTGENBESTRALING.

7.4.1. INLEIDING.

In het verleden is röntgenbestraling, vaak in sterk uiteenlopende doses, frequent toegepast bij de behandeling van psoriasis. De laatste jaren wordt deze therapie in toenemende mate gereserveerd voor hardnekkige plaques die geenzins op de normale therapie reageren (Braun-Falco & Lukacs, 1973; Röntgencommissie NVvD, 1976).

Empirisch is gebleken dat 100 R, drie doses met tussenpauzen van een week, een gunstig therapeutisch resultaat hebben. De absorptie van röntgenstralen in een parakeratotische psoriasis hoornlaag is groter dan in een normale hoornlaag zodat de reststraling onder het niveau van de epidermis bij psoriasislaesies kleiner is dan onder normale epidermis (Steigleder & Raab, 1962). De gevaren van röntgenbehandeling van benigne dermatosen zijn gering en in de moderne dermatologie geaccepteerd mits aan een aantal voorwaarden wordt voldaan (Goldschmidt, 1978).

7.4.2. MATERIAAL EN METHODE.

Bij vijf personen, allen mannen, is een geïsoleerde handpalmgrote psoriasis vulgaris plek op romp of arm bestraald. De dosis per bestraling bedroeg 100 R (30 KV, 0,30 Al, FHA: 30 cm). Bij twee personen is deze bestraling na 1 en 2 weken herhaald. Bij 2 patienten vond herhaling na 1 en 3 weken plaats, terwijl bij de laatste patient deze therapie werd herhaald op het tijdstip waarop het percentage G₂M weer de uitgangswaarde had bereikt. De omgevende huid is met lood afgedekt. Alle patienten waren onder klinische behandeling voor hun psoriasis. Op de overige psoriasislaesies werd cignoline pasta in stijgende concentraties geapliceerd. Op de geïsoleerde bestraalde psoriasisplek alsmede op de naaste omgeving is geen lokale therapie toegepast. Geen van de patienten had orale of parenterale medicamenten. De bestraling vond plaats met een Philips RT-100 Röntgenapparaat. Het voltage, het filter en de FHA zijn zodanig gekozen dat meer dan 90% van de straling nog aanwezig is ter hoogte van de basaalembraan, terwijl op 10 mm onder het huidoppervlak nog slechts ongeveer 20% van de straling resteert. Dagelijks zijn monsters voor flowcytometrisch onderzoek volgens de standaardmethode afgenomen. De proliferatiepatronen van de biopten zijn op de in hoofdstuk 3 beschreven wijze bepaald.

7.4.3. RESULTATEN.

In de DNA histogrammen van op bovengenoemde wijze bestraalde psoriasisiscellen treedt bij alle onderzochte patienten een snelle stijging van het percentage G_2M op. Na 3-4 dagen wordt een maximum bereikt waarna het percentage in enkele dagen weer daalt tot de uitgangswaarde. Fig. 7.4.1. toont een voorbeeld van deze toename en afname van G_2M fase cellen in de DNA histogrammen na röntgenbestraling. Het percentage G_2M fase cellen in de DNA histogrammen van epidermiscellen afkomstig uit een met dithranol behandelde psoriasislaesie, alsmede uit de klinisch normale huid, die geen behandeling heeft ondergaan, vertoont geen reactie op de bestraling (fig. 7.4.2.).

Fig. 7.4.2.:

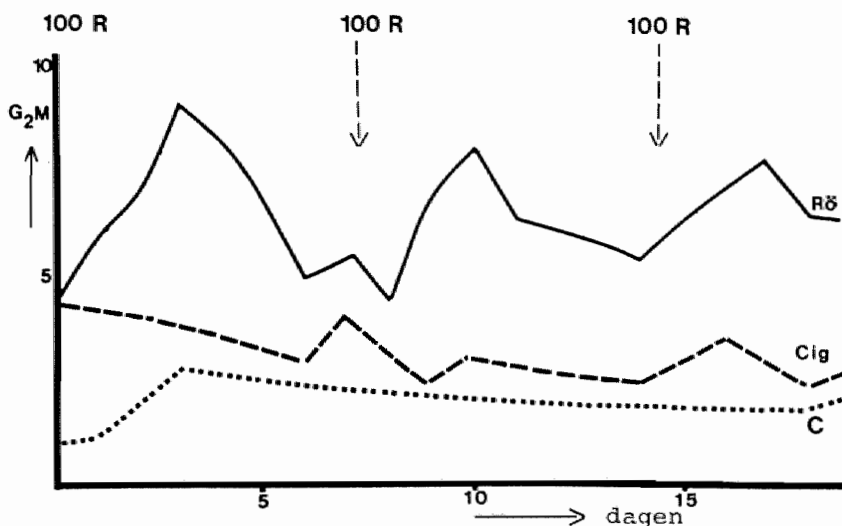


Fig. 7.4.2.: De percentages cellen in de G_2M fase in de DNA histogrammen na röntgenbestraling (Rö) (100R, 0,30 Al, 30 KV, 30 cm FHA), dithranol applicatie (cignoline in stijgende concentraties) (cig) en van klinisch niet aangetaste epidermis (c).

Synchroom met de toename van het aantal G_2M fase cellen ontstaat in de DNA histogrammen een sterke daling van het aantal S fase cellen. Het percentage S bereikt een minimum wanneer G_2M maximaal is en stijgt daarna weer geleidelijk tot de uitgangswaarde (fig. 7.4.3.).

Fig. 7.4.1.

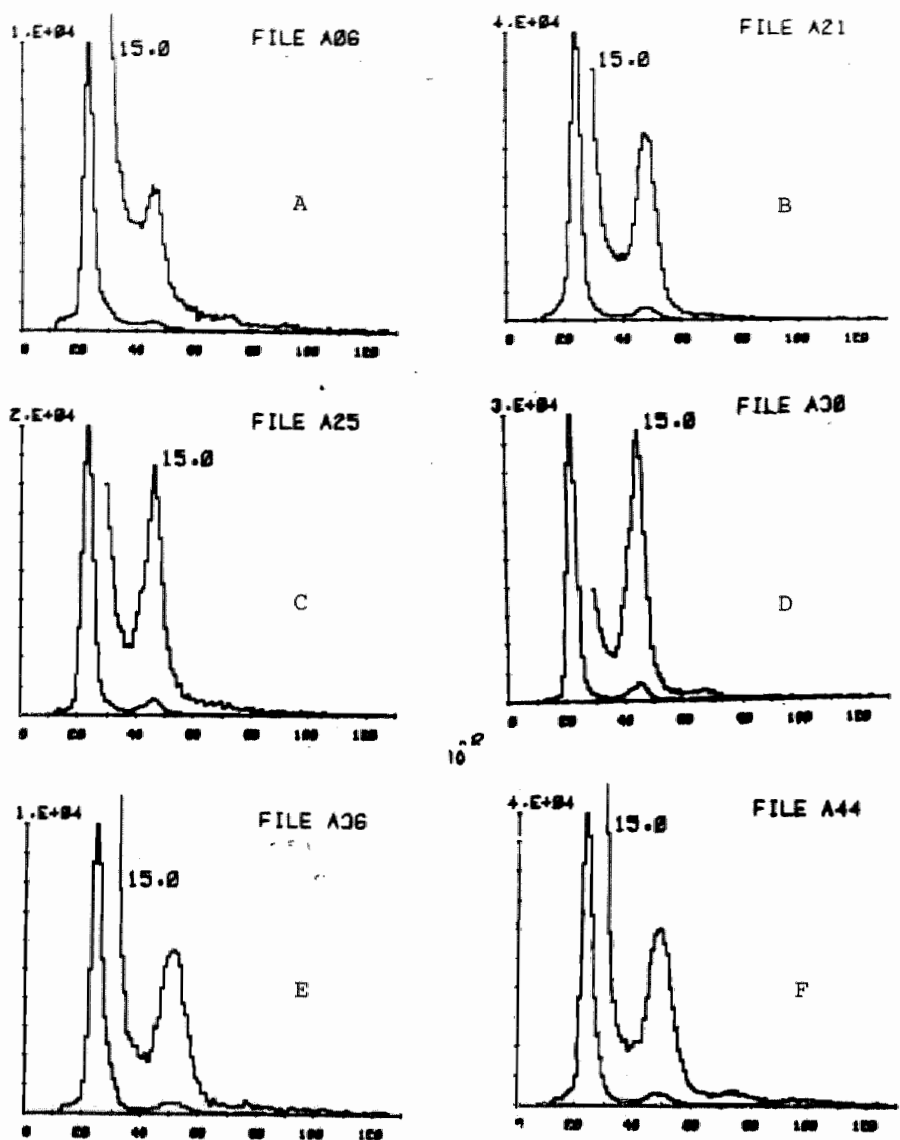


Fig. 7.4.1.: Karakteristiek voorbeeld van de toename en de daaropvolgende afname van de G_2M fractie van met röntgenbestraling behandelde psoriasiscellen in het verloop van de tijd. A: T = 0; B: T = 24 uur; C: T = 48 uur; D: T = 72 uur; E: T = 144 uur; F: T = 168 uur na bestraling met 100 R, 30 KV, 0,30 Al, FHA: 30 cm.

Fig. 7.4.3.

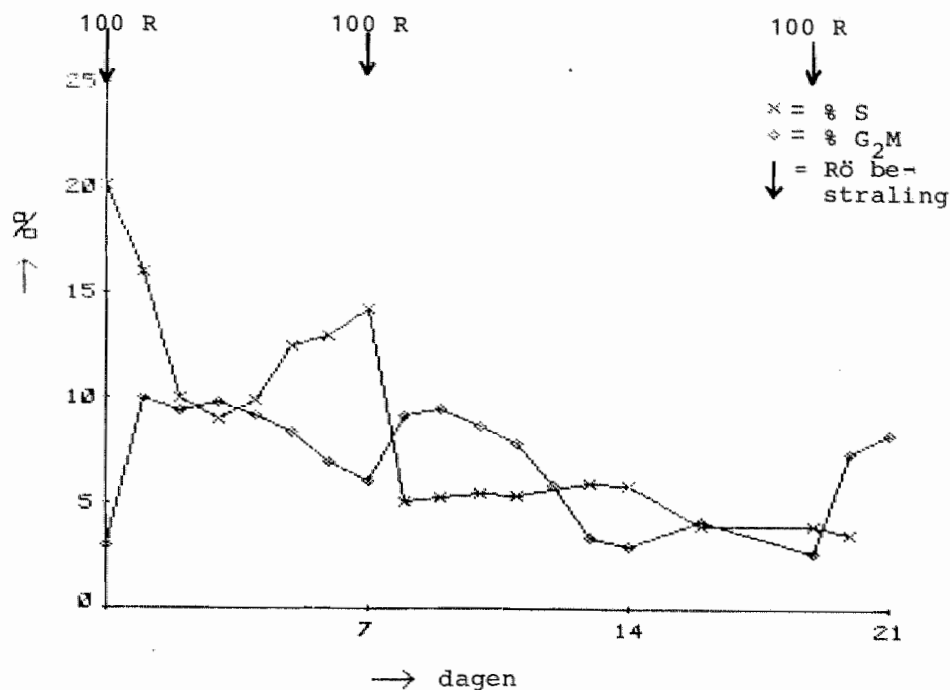


Fig. 7.4.3.: Overzicht van het verloop van de percentages S en G_2M in de DNA histogrammen in het verloop van de tijd na bestraling met 100 R (30 KV, 0,30 Al, FHA: 30 cm).

Een tweede röntgenbestraling geeft opnieuw deze effecten. Na enkele bestralingen stijgt het percentage S niet meer om uiteindelijk een niveau te bereiken van klinisch niet aangetaste epidermis bij psoriasis.

Het tijdsinterval dat nodig is om de G_2M fractie weer de uitgangswaarde te laten aannemen lijkt na elke bestraling toe te nemen (fig. 7.4.4.).

In de klinisch niet aangetaste, niet behandelde huid worden geen veranderingen in percentage S en G_2M waargenomen. Een vrijwel uniform patroon wordt bij alle onderzochte patienten gezien, zij het dat de bereikte maxima en minima individueel verschillen.

Het röntgeneffect is goed zichtbaar te maken door de ratio S/G_2M voor te stellen als functie van de tijd (fig. 7.4.5.)

Fig. 7.4.4.

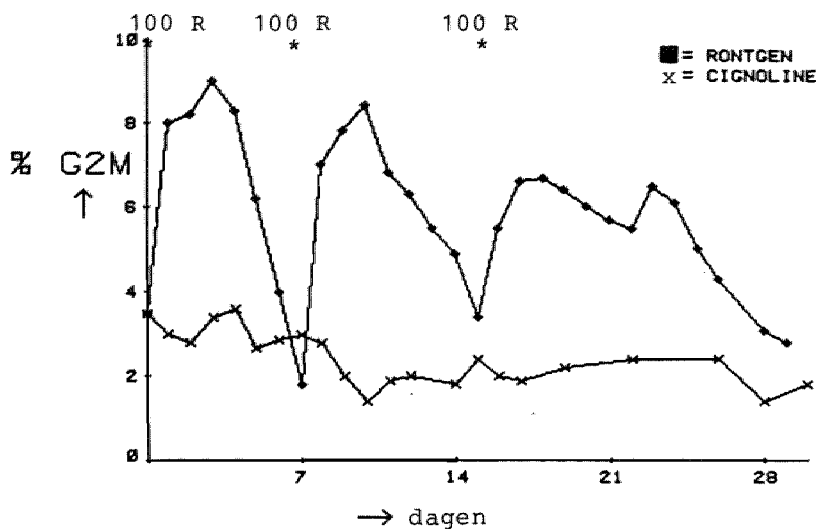


Fig. 7.4.4.: toont de percentages G_2M in de DNA histogrammen van celsuspensies uit psoriasislaesies die met röntgenstralen resp. dithranol (cignoline) zijn behandeld.

Fig. 7.4.5.

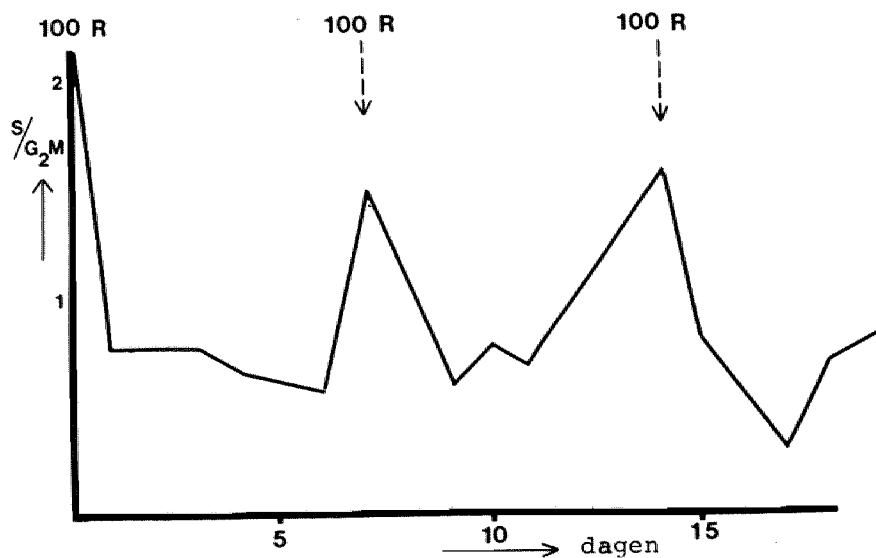


Fig. 7.4.5.: toont de ratio S/G_2M als functie van de tijd na bestralingen met 100 R (30 KV, 0,30 Al, FHA: 30 cm).

7.4.4. DISCUSSIE.

Voor het verkrijgen van inzicht in de eventuele effecten van röntgenbestraling op de celkinetiek van humane epidermiscellen zou het wenselijk geweest zijn de effecten van een éénmalige röntgenbestraling op normale huid te onderzoeken. Hiervan is echter om ethische redenen afgezien. De flowcytometrische methode is gevoelig genoeg gebleken om de veranderingen in DNA distributie in met röntgenstralen behandelde psoriasislaesies te registreren.

Een snelle stijging van het aantal cellen in de G_2M fase wordt binnen 24 uur gezien bij alle onderzochte patiënten. Na 72-96 uur wordt een maximum bereikt waarna een daling optreedt. Daar deze stijging noch in de met dithranol behandelde laesie, noch in de normaal uitzienende huid optreedt, is het aannemelijk dat zij berust op röntgenbestraling. Dit is in overeenstemming met de stijging van de G_2M fractie gevonden na röntgenbestraling door Crissmann et al. (1975). Ook interne straling door b.v. H^3 -thymidine geeft een sterke toename van het aantal cellen in de G_2M fase, waarbij de grootte en de duur van de toename afhankelijk is van de hoeveelheid geïncorporeerde radioactiviteit (Fingerhut et al., 1980; Baisch & Böhmer, 1980).

Hoewel de G_2 cellen niet van M cellen kunnen worden onderscheiden met behulp van de flowcytometer, wordt aangenomen dat verreweg de meeste cellen in deze toegenomen G_2M fractie G_2 cellen zijn, omdat bij microscopisch onderzoek geen sterke toename van het aantal mitosefiguren wordt gezien. De mogelijkheid dat late S fase cellen een bijdrage leveren aan de G_2M piek kan niet worden geëlimineerd. Niet alle fasen van de celcyclus zijn even gevoelig voor röntgenstralen. Fidorra & Linden vinden dat de overgang $S-G_2$ en de vroege G_2 fase het meest gevoelig voor röntgenstralen zijn. Het midden van de G_1 fase is in hun experimenten het minst gevoelig voor deze bestraling.

Behalve een stijging van het aantal tetraploide cellen vertonen de DNA histogrammen van alle onderzochte patiënten tevens een zeer snelle daling van het aantal cellen in de S fase, gevolgd door een stijging na 48-72 uur. In de ons bekende literatuur hebben we geen bevestiging van een dergelijke kortdurende verandering in de S fractie kunnen vinden. In onze experimenten loopt de S fractie kennelijk op korte termijn leeg. Volgens Baisch & Böhmer (1980) zou interne straling geen effect hebben op de progressie van de cellen door de S fase. Het is mogelijk dat de cellen reversibel worden gehinderd de synthese van DNA te beginnen. Wanneer dit relatief kleine percentage cellen opgaat in de 2c piek komen deze cellen niet tot uiting in de DNA histogrammen.

7.5. REFERENTIES.

Baisch, H. & Böhmer, R.M.: Effect of internal radiation of tritiated BUdR incorporated into DNA on the progression of cells through the cycle. *Flowcytometry*, 4:359-361, 1980.

Baxter, D.L. & Stoughton, R.B.: Mitotic index of psoriatic lesions treated with anthralin, glucocorticosteroid and occlusion only. *J. Invest. Derm.*, 54:410-412, 1970.

Belsito, D.V. & Kechijian, P.: The role of tar in Goeckerman therapy. *Arch. Dermatol.*, 118:319-321, 1982.

Bishop, S.C. & Gray, B.C.: DNA repair activity in human skin after ultraviolet or PUVA exposure. In: *Psoriasis, proceedings of the third international symposium*. Ed. by Farber, E.M. & Cox, A.J.: 443-444, 1981.

Born, W.: Zur Wirkung von Cignolin auf die DNS-Synthese in der Epidermis. *Hautarzt*, 20:178-181, 1969.

Braun-Falco, O. & Lukacs, S.: *Dermatologische Röntgentherapie. Ein Leitfaden für die Praxis*. Springer Verlag, Berlin, blz. 136, 1973.

Braun-Falco, O., Burg, G. & Schoefinius, H.H.: Ueber die Wirkung von Dithranol (Cignolin) bei Psoriasis vulgaris. *Arch. Derm. Forsch.*, 241:217-236, 1971.

Cole, R.S.: Light-induced cross-linking of DNA in the presence of a furocoumarin (psoralen). *Biochem. Biophys. Acta*, 217:30-39, 1970.

Comaish, S.: Ingram method for treating psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 92:56-58, 1965.

Comaish, S., Smith, J. & Seville, R.H.: Factors affecting the clearance of psoriasis with dithranol (anthralin). *Br. J. Derm.*, 84:282-293, 1971.

Cotton, D.W.K. & Van Rossum, E.: Psoriatic therapeutics and glucose-6-phosphatase dehydrogenase. *Arch. Derm. Forsch.*, 252: 147-149, 1975.

Cox, A.J. & Watson, W.: Histological variations in lesions of psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 106:503-506, 1972.

Crissmann, H.A., Mullaney, P.F. & Steinkamp, J.A.: Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. *Methods Cell. Biol.*, 9:179-246, 1975.

Dall'Acqua, F., Marciani, S., Ciavatta, L. & Rodighiero, G.: Formation of interstrand cross-linkings in the photoreactions between furocoumarins and DNA. *Z. Naturforsch.*, 26:561-569, 1971.

Dugois, P., Amblard, P., Martel, J., Morin, J. & Reymond, J.L.: La therapeutique du psoriasis par l'association ultra-violet-*anthralin*. Journées Nationales de Dermatologie, Montpellier, 1975.

Epstein, E.: Photosensitization in the treatment of psoriasis. *J. Invest. Derm.*, 8:203-207, 1947.

Epstein, J.H. & Fukuyama, K.: Effects of 8-methoxypsoralen-induced phototoxic effects on mammalian epidermal macromolecule synthesis in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 21:325-330, 1975.

Epstein, J.H., Fukuyama, K. & Fye, K.: Effects of ultraviolet radiation on the mitotic cycle and DNA, RNA and protein synthesis in mammalian epidermis in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 12:57-65, 1970.

Fidorra, J. & Linden, W.A.: Radiosensitivity and recovery of Mouse-L-cells during the cell cycle. *Radiat. Viron. Biophys.*, 14:285-294, 1977.

Fingerhut, R., Otto, F. & Kiefer, J.: Cellular radiation effects and hyperthermia: The influence of genetically determined radiosensitivity on the cytokinetic behaviour of stationary yeast cells after x-radiation and hyperthermia. In: *flowcytometry*, 4:196-199, 1980.

Fischer, T.: UV-light treatment of psoriasis. *Acta Derm. Venereol.*, 56:473-479, 1976.

Fisher, L.B. & Maibach, H.I.: In: *Psoriasis, Proceedings of the International Symposium at Stanford University*. Ed. by Farber, E.M. & Cox, A.J., p. 335, Stanford University Press, Stanford, California, 1971.

Fisher, L.B. & Maibach, H.I.: The effect of anthralin and its derivatives on epidermal cell kinetics. *J. Invest. Derm.*, 64:338-341, 1975.

Frank, L., Steiner, K. & Bender, B.: Fluandrenolone and occlusion in psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 89:404-410, 1964.

Fry, L. & McMin, R.M.H.: The action of chemotherapeutic agents on psoriatic epidermis. *Br. J. Derm.*, 80:373-383, 1968.

Galewsky, E.: Ueber Cignolin, ein Ersatzpräparat des Chrysarobins. *Derm. Wschr.*, 62:111-115, 1916.

Goeckerman, W.H.: The treatment of psoriasis. *Northwest Med.*, 25:229-231, 1925.

Goldschmidt, H.: FDA Recommendations on radiation of benign diseases. *Arch. Dermatol.*, 114:1149, 1978.

Honigsmann, H., Jaenicke, K.F., Brenner, W., Rauschmeier, W. & Parrish, J.A.: Unscheduled DNA synthesis in normal human skin after single and combined doses of UV-A, UV-B and UV-A with methoxsalen (PUVA). Br. J. Derm.,105:491-501,1981.

Ingram, J.T.: The approach to psoriasis. Br. Med. J.,2:591-594,1953.

Ingram, J.T.: The significance and management of psoriasis. Br. Med. J.,2:823-828,1954.

Kammerau, B., Zesch, A. & Schaefer, H.: Absolute concentrations of dithranol and triacetyl-dithranol in the skin layers after local treatment. J. Invest. Derm.,64:145-149, 1975.

Kenicer, K.J.A., Lakshmipathi, T., Addo, H.A., Johnson, B. E. & Frain-Bell, W.: An assessment of the effect of photochemotherapy (PUVA) and UV-B phototherapy in the treatment of psoriasis. Br. J. Derm.,105:629-639,1981.

Klem, E.B.: Effects of antipsoriatic drugs and metabolic inhibitors on the growth of epidermal cells in culture. J. Invest. Derm.,70:27-31,1978.

Krebs, A. & Schaltegger, H.: Experimentelle Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Chrysarobin und Dithranol bei Psoriasis (Indizen für eine cytostatische Wirkung an der Epidermis). Dermatologica,131:1-27,1969.

Krüger, J.P., Christophers, E. & Schlaak, M.: Dose-effects of 8-methoxypsoralen and UV-A in cultured human lymphocytes. Br. J. Derm.,98:141-144,1978.

Lata, K., Jain, V., Mishra, R. & Bhutani, L.: In vitro effects of 2-deoxy-d-glucose after photochemotherapy of psoriasis. In: Psoriasis, Proceedings of the third International Symposium. Ed. by Farber, E.M. & Cox, A.J.:439-440,1981.

Lawler, L.C. & Vineyard, W.R.: The effect of treatment on the vascular component of psoriasis lesion. Arch. Dermatol., 82:190-193,1960.

Lehmann, K.E.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Permeation von Anthralin (Cignolin,Bayer) in die menschliche Haut. Med. Diss.,Düsseldorf,1965.

Lerche, A., Sondergaard, J., Wadskov, S., Leick, V. & Bohr, V.: DNA interstrand crosslinks visualised by electron microscopy in PUVA treated psoriasis. Acta Dermatoven.,59:15-20,1979.

LeVine, M.J. & Parrish, J.A.: Outpatient phototherapy of psoriasis. Arch. Dermatol.,116:552-554,1980.

LeVine, M.J., White, H.A.D. & Parrish, J.A.: Components of the Goeckerman regimen. *J. Invest. Derm.*, 73:170-173, 1979.

Liden, S. & Michaësson G.: Dithranol (anthralin) in psoriasis. *Br. J. Derm.*, 91:447-456, 1974.

Martinmaa, J., Juselius, J. & Mustakallio, K.: Free radicals by auto-oxidation of anthralin and its 10-acyl analogues. *Br. J. Derm.*, 105:52, 1981.

Meiers, H.G., Kühling, K. & Ippen, H.: Untersuchungen über die enzymhemmende Wirkung von 1,8-dihydroxy-anthranol-9 (Cignolin). *Dermatologica*, 136:497-503, 1968.

Mier, P.D., Van Den Hurk, J., Bauer, F.W., De Grood, R.M. & Roelfzema, H.: Mitotic activity and acid hydrolase levels in human epidermis following a single dose of ultraviolet radiation. *Br. J. Derm.*, 96:163-165, 1977.

Mortazawi, S.A.M. & Oberste-Lehn, H.: Lichtsensibilisatoren und ihre therapeutischen Fähigkeiten. *Z. Haut Geschlechtskr.*, 48:1-9, 1973.

Musajo, L., Bordin, F., Caparole, G., Marciani, S. & Rigatti, G.: The mechanism of action of the skin photosensitizing furocoumarins. *Acta Dermatovenereol.*, 47:298-303, 1967.

Musajo, L. & Rodighiero, G.: Photophysiology, vol. VII, (ed. by A.C. Giese) pp. 115-147, Academic Press, New York, 1972.

Mustakallio, K.: Irritation, staining and antipsoriatic activity of 10-acyl analogues of anthralin. *Br. J. Derm.*, 105: 23-27, 1981.

Oppenheim, M.: Die Behandlung der Psoriasis vulgaris mit intravenösen Tryptaflavininjektionen und Quarzlicht. *Strahlentherapie*, 29:268-274, 1928.

Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L. & Pathak, M.A.: Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and long wave ultraviolet light. *N. Eng. J. Med.*, 291:1207-1211, 1974.

Pathak, M.A. & Krämer, D.M.: Photosensitization of skin in vivo by furocoumarins (psoralens). *Biochim. Biophys. Acta.*, 195:197-206, 1969.

Pullmann, H., Enderer, K. & Steigleder, G.K.: Cytokinetic effects of anthralin on psoriatic keratinocytes. *Br. J. Derm.*, 105:55-56, 1981.

Raab, W.: Die Wirkung externer Antipsoriatica auf die Gewebsatmung menschlicher und tierischer Haut. *Arch. klin. exp. Derm.*, 234:44-51, 1969.

- Rassner, G.: Aktivitätshemmung von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels durch Dithranol. Arch. klin. exp. Derm., 241: 237-244, 1971.
- Rodighiero, G.: Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins: Photoreactivity of various furocoumarins with native DNA and with ribosomal RNA. Biochim. Biophys. Acta, 217: 40-49, 1970.
- Röntgencommissie Nederlandse Vereniging van Dermatologen. Bestuurlijk schrijven, 1976.
- Schaefer, H., Farber, E.M., Goldberg, L. & Schalla, W.: Limited application period for dithranol in psoriasis. Br. J. Derm., 102: 571-573, 1980.
- Schauder, S. & Mahrle, G.: Kombinierte Einstundentherapie der Psoriasis mit Anthralin und uv-Licht. Hautarzt, 33: 206-209, 1982.
- Segal, A., Katz, Ch. & Duuren, B.L.: Structure and tumour promoting activity of anthralin (1,8-dihydroxy-9-anthrone) and related compounds. J. Med. Chem., 14: 1152-1154, 1971.
- Selim, M.M., Goldberg, L., Schaefer, H., Bishop, S. & Farber, E.M.: Penetration studies on topical anthralin. Br. J. Derm., 105: 101-103, 1981.
- Steigleder, G.K. & Raab, W.: Absorption of x-rays in psoriatic parakeratotic horny layers. J. Invest. Derm., 38: 299-304, 1962.
- Steigleder, G.K., Schumann, H. & Lennartz, K.J.: Autoradiografie in vitro-examination of psoriatic skin before during and after dithranol treatment. Arch. Derm. Forsch., 246: 231-235, 1973.
- Swanbeck, G. & Thyresson, N.: Interaction between dithranol and nucleic acids. Acta Dermatovener., 45: 344-348, 1965.
- Swanbeck, G. & Zetterberg, G.: Studies on dithranol and dithranol-like compounds. Acta Dermatovener., 51: 41-44, 1971.
- Swanbeck, G., Thyresson, N., Bredberg, A. & Lambert, B.: Treatment of psoriasis with oral psoralens and longwave ultraviolet light. Acta Dermatovener., 55: 367-376, 1975.
- Tuliplan, L.: Treatment of psoriasis with photosensitizing agents. Arch. Derm. Syph., 43: 99-102, 1941.
- Unna, P.G.: Cignolin als Heilmittel der Psoriasis. Derm. Wschr., 62: 116-137; 150-163; 175-183, 1916.
- Walter, J.F., Stoughton, R.B., Dequoi, P.R.: Suppression of epidermal proliferation by ultraviolet light, coal tar and anthralin. Br. J. Derm., 99: 89-96, 1978.

Weber, G.: Combined 8-methoxasalen and black light therapy of psoriasis. Br. J. Derm.,90:317-323,1974.

Weigand, D.A. & Everett, M.A.: Clearing of resistant psoriasis with anthralin. Arch. Dermatol.,96:554-559,1967.

Weinrich, E.G. & Kettlewell, P.J.: Die Einführung des Chrysarobins in Europa. Dermatologica,144:115-127,1972.

Wolff, K., Hönigsmann, H., Gschait, F. & Konrad, K.: Photochemotherapie bei Psoriasis. Klinische Erfahrungen bei 152 Patienten. Dtsch. med. Wschr.,100:2471-2477,1975.

Wolff, K., Henseler, T., Hönigsmann, H., Christophers, E. and 30 participating investigators: The European PUVA study: 3000 patients. In: Psoriasis, Proceedings of the third International Symposium, Ed. by Farber, E.M. & Cox, A.J.:427-428, 1981.

Zetterberg, G. & Swanbeck, G.: Studies on dithranol and dithranol like compounds II, Mutagenicity. Acta Dermatovener., 51:45-49,1971.

SAMENVATTING.

In HOOFDSTUK 1 wordt een beknopt overzicht gegeven van het ziektebeeld psoriasis, waarbij slechts op enkele aspecten van dit complexe phenomeen wordt ingegaan teneinde de niet met deze aandoening bekend zijde lezer enige kennis van deze huidafwijking te bieden.

In HOOFDSTUK 2 wordt een literatuuroverzicht van in de loop der jaren toegepaste methoden ter bestudering van de celkinetiek gegeven, toegespitst op normale humane epidermis en psoriasis. De door diverse auteurs gevonden waarden voor celcyclustijden en turnovertijden van normale epidermis lopen sterk uiteen en zijn op onderdelen tegenstrijdig. Bij psoriasis zijn alle auteurs het erover eens dat de proliferatieactiviteit is verhoogd, zij het met forse verschillen in toename. De meningen over de duur van de synthesefase van een prolifererende psoriasiscel zijn tegenstrijdig. Over een verkorting van de totale celcyclustijd bij psoriasis, zij het ook weer in wisselende mate, zijn alle auteurs het eens. De flowcytometrische onderzoeken naar celkinetische aspecten van normale en pathologisch veranderde humane epidermis zijn beperkt in de literatuur maar bieden goede mogelijkheden tot statistisch meer betrouwbaar celkinetisch onderzoek.

In HOOFDSTUK 3 wordt de in dit onderzoek gebruikte flowcytometrische methode uiteengezet. De flowcytometer, de afname techniek, de bewerking van het monster, de analyse van de gegevens en een aantal moeilijkheden bij de interpretatie worden achtereenvolgens beschreven.

In HOOFDSTUK 4 worden de DNA distributies in normale humane epidermis vermeld. De invloed van het geslacht, de leeftijd en de plaats op het lichaam is onderzocht. Tevens is gekeken naar verschillen in DNA verdeling tussen twee specifieke tijden van het jaar. Uit de verkregen waarden is een schatting gemaakt van de turnovertijd van het levend epitheel (18,5 dagen) en de gemiddelde celcyclustijd (139 uur) van een normale keratino-cyt.

In HOOFDSTUK 5 worden de DNA distributies in psoriasis vulgaris, onrustige psoriasis en psoriasis pustulosa vermeld. De onderlinge verschillen in percentage cellen in de S en G₂M fase zijn significant tussen deze drie vormen van psoriasis. Vergeleken met normale epidermis is bij psoriasis de variatie in de individuele specimens groot. De intra- en inter-

individuele variantie alsmede de intralaesionale variantie is onderzocht. De individuele subpopulaties blijken significant meer homogeen te zijn dan de totale populatie. Binnen eenzelfde laesie zijn er in de hier onderzochte parameters geen verschillen tussen rand en centrum van de laesie.

In de klinisch niet aangetaste epidermis bij personen met psoriasis is de DNA distributie significant verschillend van die in normale epidermis en in psoriasis. Het percentage S en G₂M heeft waarden tussen die van normale huid en van psoriasis in.

Ook voor een psoriasiscel is uit de verkregen waarden een schatting gemaakt van de celcyclustijd (67 uur) en de turn-overtijd (5,5 dagen).

In HOOFDSTUK 6 zijn de DNA distributies in klinisch niet aangetaste epidermis en in laesies van neurodermitis, lichen ruber planus en m. Darier onderzocht.

Bij lichen ruber planus en m. Darier is er geen verschil tussen laesie en normaal uitziende huid; bij neurodermitis is het percentage cellen in de S fase significant hoger in de laesie.

Normale epidermis verschilt in de hier onderzochte parameters niet van de normale epidermis bij deze drie huidaandoeningen.

Neurodermitislaesies verschillen significant voor de S en G₂M fractie van de celcyclus van de overeenkomstige fracties van zowel normale epidermis bij controle personen als van psoriasislaesie.

Lichen ruber laesie verschilt niet van normale epidermis.

Bij m. Darier zijn de verschillen in de onderzochte parameters van de celcyclus net significant verschillend van die van normale epidermis.

Psoriasis verschilt in percentage S van alle drie dermatosen.

In HOOFDSTUK 7 zijn met behulp van de flowcytometer de therapie-effecten van dithranol applicatie, Goeckerman therapie, PUVA behandeling en röntgenbestraling op een psoriasislaesie bepaald.

Dithranol applicatie blijkt een asymmetrie van de rechter flank van de 2c piek te geven. Voor deze asymmetrie zijn meerdere oorzaken denkbaar. Het feit dat ook de 4c piek een asymmetrische rechter flank vertoont doet ons ertoe neigen een voorkeur uit te spreken voor de hypothese dat onder invloed van dithranol applicatie een subpopulatie keratinocyten ontstaat die een afwijkende kleuringskarakteristiek heeft.

In de psoriasiscellen afkomstig uit laesies die een Goeckerman behandeling hebben ondergaan wordt slechts een minimale daling van het percentage S en G₂M gezien.

Een éénmalige PUVA behandeling van normale epidermis geeft een tijdelijke toename van de 4c piek. Ook in psoriasiscellen treedt na dagelijks PUVA bestralingen na een individueel bepaalde tijd, een sterke stijging van de G₂M fractie op.

In de klinisch niet aangetaste epidermis blijkt de grootte van deze toename afhankelijk te zijn van het aantal Joules/cm² opgestraald UVA licht. Het therapeutische effect van PUVA lijkt te bestaan uit eliminatie in de G₂ fase van een aantal cellen uit de prolifererende populatie. Ook in de DNA histogrammen van celsuspensies van eenmalig met röntgenstralen behandelde psoriasislaesies treedt een sterke stijging van het percentage G₂M op. Na enkele dagen daalt dit percentage weer tot de uitgangswaarde. Synchroon met de toename van het aantal G₂M fase cellen ontstaat een sterke daling van het aantal DNA synthetiserende cellen. Het percentage S bereikt een minimum wanneer G₂M maximaal is en stijgt vervolgens weer. Een tweede bestraling geeft opnieuw deze effecten. Na enkele bestralingen stijgt het percentage S niet meer om uiteindelijk een niveau te bereiken van klinisch niet aangetaste epidermis bij psoriasis. Het tijdsinterval dat nodig is om de G₂M fractie weer de uitgangswaarde te laten aannemen lijkt na elke bestraling toe te nemen. De tijdelijke toename van cellen in het G₂M compartiment kan verklaard worden door aan te nemen dat een deel van de de celcyclus doorlopende celpopulatie irreversibel in de G₂ fase wordt geblokkeerd. De hieropvolgende daling wordt dan veroorzaakt door lysis of door migratie van de geblokkeerde cellen naar het huidoppervlak.

SUMMARY.

In CHAPTER 1 a short review is presented of the syndrome psoriasis. Only some aspects of this complex phenomenon are discussed.

In CHAPTER 2 a synopsis is given of the literature concerning the methods applied throughout the years, to study cell kinetics of normal human epidermis and psoriasis. Cell cycle times and turnover times of normal epidermis as calculated by different authors, differ significantly and some of the results are even contradictory. In case of psoriasis all authors agree on an increased proliferation activity, although with rather diverging values. Opinions on the duration of the S phase of a proliferative psoriatic cell are contradictory. All authors agree however that the cell cycle time of psoriatic keratinocytes is shorter, though this is difficult to establish quantitatively. The flow cytometric studies of cell kinetics of normal and pathologically changed human epidermis are rare in literature, but they offer good possibilities towards statistically more reliable cell kinetic research.

In CHAPTER 3 the flow cytometric method as used in this study is outlined. The flow cytometer, the sampling technique, the preparation of the sample, the analysis of the data and a number of difficulties in interpretation are successively described.

In CHAPTER 4 flow cytometric measurements of the DNA content are performed on a large number of skin biopsies of normal human epidermis. The influence of sex, age and body-site is examined. Moreover, differences in DNA distribution between two specific times of the year have been looked into. Crude estimations of turnover time of the viable epidermis (18,5 days) and of the mean cell cycle time (139 hours) of normal keratinocytes have been made.

In CHAPTER 5 the DNA distributions in psoriasis vulgaris, unstable psoriasis and psoriasis pustulosa are reported. The differences in percentages of cells in the S and G₂M phases are significant between these three types of psoriasis. Compared to normal skin the variation between the individual specimens is rather large. The intra- and inter-individual variance as well as the intralesional variance have been examined. The individual subpopulations are significantly more homogeneous than the total population. No significance of possible differences between rim and centre of the lesion could be detected. In uninvolved skin of patients with psoriasis the DNA distribution differs significantly from those of psoriasis lesion and normal skin. The values obtained for the percentages of S and G₂M cells of uninvolved skin are found in between those of normal

skin and psoriasis.

The turnover time of psoriatic skin (5,5 days) and the cell cycle time (67 hours) of the psoriatic keratinocytes have been estimated.

In CHAPTER 6 the DNA distributions in lesions and in uninvolved skin of patients with neurodermatitis, lichen ruber planus and morbus Darier (dyskeratosis follicularis) are presented. Lichen ruber planus and m. Darier show no difference between involved and uninvolved skin. In involved skin of neurodermatitis the percentage of S phase cells is significantly elevated.

The significance of possible differences between the involved and uninvolved skin of these three dermatoses and normal and psoriatic skin is successively discussed.

In CHAPTER 7 changes in DNA distribution in psoriatic skin during different types of therapy are investigated. During dithranol therapy a temporal asymmetry of the right flank of the 2c peak was observed. Several explanations for this phenomenon are possible. We would like to believe that application of dithranol stimulates the development of a subpopulation of psoriatic keratinocytes with abnormal colour characteristics.

Psoriatic cells treated with Goeckerman regimen show only minor changes in the percentages of cells in S and G_2M . The effect of a single dose of PUVA on normal keratinocytes is a temporal increase of the percentage 4c cells.

In psoriatic cells an increase in the percentage of G_2M was measured following daily PUVA treatments. However there were differences in individual response.

In uninvolved skin the rate of increase depends on the dose of UVA light.

The therapeutic effect of PUVA seems to consist of a removal in the G_2 phase of a part of the proliferative cells from the population.

After a single dose of x-rays we observe an increase in the percentage G_2M , reaching a maximum value after 3-4 days. Thereafter the percentage G_2M steadily drops. Synchronously a sharp decrease in the percentage S is observed, the lowest point of which coincides with the highest point of G_2M . Thereafter the percentage S increases towards its original value. A second radiation dose produces similar effects, although the maxima and minima are less marked. After several radiation doses the percentage S shows no increase anymore and will reach a level comparable to that of uninvolved psoriatic skin and it takes a longer time for the G_2M to become normal again. The temporal increase of cells in G_2M after x-ray radiation can be explained by assuming that a fraction of the cycling cells is being irreversibly blocked in the G_2 phase of the cell cycle and that the gradual removal of the blocked cells from the population is taken place by lysis or migration to the skin surface.

De auteur dankt allen die direct of indirect hebben bijgedragen aan de tot stand koming van dit proefschrift. In het bijzonder wil ik bedanken Prof. Dr. W.J.B.M. van de Staak en Dr. F.W. Bauer. Zonder de steun van de eerste en het geduld van de laatste zou dit proefschrift het levenslicht niet hebben aanschouwd.

Gaarne wil ik noemen Prof. Dr. J.W.H. Mali die mij tijdens mijn opleiding tot dermatoloog in de gelegenheid heeft gesteld het wetenschappelijk werk te verrichten dat tot dit proefschrift heeft geleid.

Ing. G.J. de Jongh en Ir. J.B.M. Boezeman dank ik voor hun vele arbeid betreffende de statistische bewerking van de verkregen meetresultaten.

Ook ben ik dank verschuldigd voor de consistente medewerking die ik heb mogen ondervinden van Mevr. R.M. Maassen-De Grood bij het laboratoriumwerk en van Mevr. W. Verbeeck-Silla die de basisversies van dit proefschrift heeft getypt. Zeker wil ik niet vergeten Marion Teunissen voor het vele werk besteed aan het uittypen van de uiteindelijke tekst. Tenslotte een zeer speciaal woord van dank aan mijn vrouw Rini die mij met raad en daad terzijde heeft gestaan en aan mijn dochters Laurence en Anne-Claire die steeds voor de nodige afleiding hebben gezorgd. Zeer in het bijzonder ben ik ook dank verschuldigd aan de vele patienten die door hun grote bereidwilligheid de vaak vele benodigde huidmonsters beschikbaar te stellen een conditio sine qua non vormden voor de realisatie van dit proefschrift.

CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd geboren op 26 december 1948 te Bunde.

In 1967 behaalde hij het einddiploma gymnasium beta aan het Henric van Veldeke College te Maastricht.

Daarna studeerde hij geneeskunde aan de Rijksuniversiteit Leiden, waar op 2 april 1972 cum laude het doctoraalexamen en op 21 juni 1974 het artsexamen werd behaald.

Na een korte periode als waarnemend huisarts was hij tot augustus 1975 werkzaam als dienstplichtig militair arts, terwijl in deze periode tevens een assistentschap interne geneeskunde (T.M.J. Ottenhoff, Breda) werd vervuld.

In augustus 1975 startte hij met de opleiding tot dermatoloog in de Universiteitskliniek voor Huidziekten te Nijmegen (hoofd: prof. Dr. J.W.H. Mali). Registratie als dermatoloog vond plaats op 11 augustus 1979.

Sedertdien wordt de dermatologische praktijk uitgeoefend in associatief verband met A.J.M. Penders en volgde aanstelling als staflid in het Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis te Nijmegen (Directeur-Genesheer: W.Th.F. Filippini).