

Promjene aktivnosti kisele fosfataze (KF) kod oralnog lichen planusa pri različitom kliničkom intenzitetu bolesti.

I. Promjene aktivnosti kisele fosfataze u epitelnim stanicama

Changes of Acid Phosphatase (AP) Activity in Various Clinical Stages of Oral Lichen Planus.

I. Changes of Acid Phosphatase Activity in Epithelial Cells

Sažetak

Na 33 biopsijska uzorka s oralnog lichen planusa (OLP) i 18 s leukoplakije (LPL) primjenom histokemijske metode ispitivana je aktivnost kisele fosfataze (KF) u epitelnim stanicama pri različitom kliničkom intenzitetu bolesti. Pri različitom kliničkom stupnju upalne reakcije zapažena je značajno veća učestalost enzimom KF obilježenih stanica u slučaju OLP-a u odnosu na LPL ($p=0,02$). Intenziviranjem kliničkog stupnja upalne reakcije opazili smo pad aktivnosti KF-a u epitelnim stanicama OLP-a kao i LPL-a. Analiza intenziteta aktivnosti KF-a u epitelu pokazala je općenito jaču reakciju u gornjim slojevima epitela (rožnatom i zrnatom), osobito kod LPL-a, dok je potpuno izostala u stanicama bazalnog sloja u obje bolesti. Učestalost KF-om obilježenih epitelnih stanica pri različitom kliničkom stupnju hiperkeratoze kod OLP-a bila je gotovo identična nalazu kod upale, ali obrnuto proporcionalna nalazu kod LPL-a. Ti rezultati govore za različitu metaboličku aktivnost u epitelnim stanicama kod istoga patološkog procesa, upale ili hiperkeratoze dviju klinički sličnih bolesti, koji mogu biti od diferencijalnodijagnostičkog i prognostičkog značenja.

Ključne riječi: oralni lichen ruber planus, leukoplakija, oralni epitel, histokemija, kiselna fosfataza

Marinka Mravak-Stipetić
Ahmed Pirkić*
Milutin Dobrenić
Ana Cekić-Arambašin

Zavod za bolesti usta
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
*Klinički zavod za patologiju
"Prof. dr. Ljudevit Jurak"
Kliničke bolnice "Sestre
milosrdnice" Stomatološkog
fakulteta u Zagrebu

Acta Stomatol. Croat.
1995; 30:91—96

IZVORNI
ZNANSTVENI RAD

Primljeno: 10. ožujka 1995.
Received: March 10, 1995.

Uvod

Detekcija staničnih podgrupa i pojedinih stanica tkiva kao i staničnih elemenata unaprijeđena je primjenom histoenzimskih markera koji uz identifikaciju pojedinačnih konstituenata stanice mogu i točnije odrediti njihovu funkcionalnu fazu. Jedni su od takvih markera i određeni enzimi čija se primjena kao i procjena njihove aktivnosti u stanicama pokazala korisnom i selektivnom metodom za pobliže određivanje patoloških procesa u tkivima (1, 2, 3). Obilježavanje upalnih stanica s kiselom fosfatazom (KF) kod oralnog lichen planusa (OLP) prikazano je radi ispitivanja enzimske aktivnosti u stanicama koje na određenoj lokalizaciji imaju funkcionalno značenje (3—8).

Raihl (8) je u komparativnoj histoenzimskoj studiji zdravog oralnog epitela i epitela oboljelog od OLP-a našao da kod OLP-a, u stanicama oralne sluznice u području oštećenja tkiva, dolazi do promjene u aktivnosti kisele fosfataze u lisosomima osobito bazalnih i spinoznih stanica. Te su se promjene očitovale u smanjenoj propusnosti lisosomalne membrane, što je u cijelosti upućivalo na smanjenu aktivnost kisele fosfataze u epitelu OLP-a.

Primjenom metode prikazivanja kisele fosfataze (KF) htjeli smo ispitati i usporediti enzimsku aktivnost u stanicama oralnog epitela pri različitom kliničkom intenzitetu upalne reakcije i hiperkeratoze u lezijama oralnog lichen planusa u odnosu na leukoplakiju (LPL) i procijeniti razlike u patološkim zbivanjima kod tih dviju bolesti.

Ispitanici i postupak

U ispitivanju je sudjelovao 51 ispitanik iz ambulante kazuistike Zavoda za bolesti usta Stomatološkog fakulteta u Zagrebu, od kojih je 33 bolesnika imalo oralne lezije lichen planusa (OLP), a 18 leukoplakiju (LPL). Bolesnici s LPL-om bili su kontrolna skupina. Kriteriji izbora ispitanika za to ispitivanje bili su: prisutnost kliničkih i histopatoloških manifestacija OLP-a i LPL-a prema WHO definiciji (9, 10), kao i negativan nalaz mikrobioloških testova na *Candida albicans* s tih lezija (11). Među ispitanicima s oralnim lichenom planusom 20 je imalo karakterističan retikularni oblik lichen planusa, 7 erozivni i 6 pločasti oblik. U jednom slučaju erozivnog oblika histološki je verificirana displa-

zija I. stupnja (9, 12). Svi ispitanici s OLP-om imali su samo oralne manifestacije bolesti bez popratnih kožnih promjena. Od ispitanika s LPL-om 16 je imalo histološki verificiranu homogenu leukoplakiju, a dva verukoznu bez displastičnih promjena (9, 13).

Od svih ispitanika uzeti su biopsijski uzorci s lezija OLP-a i LPL-a na različitim lokalizacijama oralne sluznice. Lokalizacija oralnih lezija određena je prema shemi Roed-Petersen i Roenstrup (14). Uzorci su uzeti na granici bolesnog i zdravog tkiva pod lokalnom anestezijom.

Uzimanju biopsijskog materijala za morfološku analizu prethodila je klinička registracija intenziteta upalne reakcije i hiperkeratoze u oralnim lezijama OLP-a i LPL-a tijekom oralnog pregleda koji su obavila dvojica ispitivača metodom dvostruke provjere, i ocijenjena stupnjevima od 1—3.

Stupanj 1 upalne reakcije (U1) označuje optički tek vidljivu upalnu reakciju, odnosno lokaliziranu promjenu boje oralne sluznice u crvenu slabu intenziteta i opsega manjeg od 1 cm².

Stupnjem 2 (U2) označen je srednji intenzitet upalne reakcije uz prisutnost eritema i atrofične površine opsega većeg od 1 cm².

Stupnjem 3 (U3) označena je proširena upalna reakcija jakoga intenziteta, izrazito crvene boje, s prisutnom erozijom sluznice površine veće od 1 cm².

Intenzitet hiperkeratotične zone na oralnoj sluznici kod OLP-a i LPL-a procijenjen je na temelju promjene boje sluznice u bjelkastosivu i veličine lezije stupnjevima od 1 do 3.

Stupnjem 1 (H1) ocijenjena je slaba hiperkeratoza koja je po boji bjelkastosiva i jedva se zapaža na oralnoj sluznici, a po opsežnosti ne zauzima prostor veći od 1 cm².

Stupnjem 2 (H2) ocijenjena je hiperkeratoza koja je vidljiva promjenom boje u bijelosivu i zahvaća površinu sluznice u opsegu većem od 1 cm².

Stupnjem 3 (H3) ocijenjena je hiperkeratotična zona intenzivno bijele boje i većeg opsega od 1 cm².

U vrijeme uzimanja biopsijskog uzorka ispitanici nisu bili pod terapijom ispitivanih bolesti OLP-a i LPL-a.

Uzorci tkiva sluznice usne šupljine podvrgnuti su uobičajenoj obradi za histopatološku (14) i za histoenzimsku analizu.

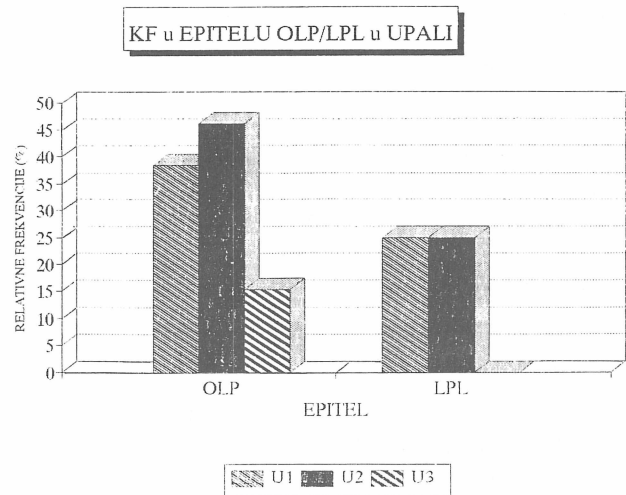
Za histoenzimsku analizu uzorci tkiva stavljani su nakon fiksacije u hipertoničnu otopinu puferirane saharoze (0,1 M) u kojoj su bili najdulje dva dana, pohranjeni u hladnjaku. Ovako priređeni uzorci tkiva rezani su na mikrotomu tvrtke "Reichert" na rezove debljine do 5 μ .

Mikroskopsko očitovanje aktivnosti KF-a primjenom sintetičkih naftolskih supstrata prikazano je metodom simultanog vezivanja supstrata. Kao reagensija simultanog vezivanja primijenjen je heksazonijev pararozanilin koji je neposredno prije inkubacije pripremljen iz NaNO₂ (1,3 ml) i iz pararozanilina ("Merck"), 1,2 ml uz pH=5,8. Za prikazivanje aktivnosti KF-a inkubacijski medij sadržavao je: naftol AS-BI fosfat 4 mg i acetatni pufer 0,1 M, pH=5,2 10 ml. Inkubacijskom mediju dodano je 0,8 ml heksazonijevog pararozanilina. Inkubacija je trajala 60 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije rezovi su kratko isprani u destiliranoj vodi, postavljeni na predmetnicu i uronjeni u rastuću koncentraciju alkohola i ksilola, nakon čega su uklopljeni kanadskim balzomom. Nakon dehidracije kontrastno su obojeni 1%-tnom vodenom otopinom metilenskog zelenila. Finalni produkt enzimske reakcije u epitelnim stanicama očitovao se kao pigment jarkocrvene boje.

Intenzitet aktivnosti kisele fosfataze ocijenjen je vizualno kao: negativna, slaba i jaka aktivnost. Učestalost obilježenih epitelnih stanica procijenjena je semikvantitativno prema sljedećim kriterijima: 0 = nema obilježenih stanica, + = oskudan nalaz obilježenih stanica, ++ = umjeren povećan nalaz obilježenih stanica, +++ = nalaz brojnih obilježenih stanica. Značajnost razlika u učestalosti obilježenih epitelnih stanica pri različitim kliničkim stupnjevima upalne reakcije i hiperkeratoze između OLP-a i LPL-a procijenjena je hi-kvadrat testom, uz stupanj značajnosti od 5%. Rezultati su iskazani u relativnim frekvencijama i prikazani grafički.

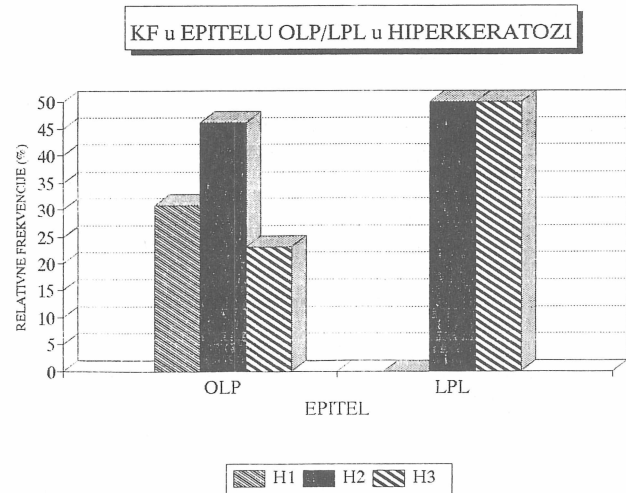
Rezultati

Učestalost obilježenih stanica s kiselom fosfatazom (KF) u epitelu kod OLP-a u odnosu na leukoplakiju (OLP/LPL) pri različitim kliničkim stupnjevima upalne reakcije prikazana je na slici 1. Zapažena je dvostruko veća učestalost enzima KF-a obilježenih epitelnih stanica u slučaju OLP-a nego kod LPL-a. Porastom inten-



Slika 1. Aktivnost kisele fosfataze (KF) u epitelnim stanicama lezija oralnog lichen planusa (OLP) i leukoplakije (LPL) pri različitim kliničkim stupnjevima upale; (U1=upala slaba intenziteta, U2=upala srednjeg intenziteta, U3=upala jakog intenziteta, U0=stanje bez upale).

Figure 1. Histoenzymatic activity of acid phosphatase in epithelial cells in lesions of oral lichen planus (OLP) and leukoplakia (LPL) in various clinical degrees of inflammation; (U1=weak inflammation, U2=mild inflammation, U3=severe inflammation).



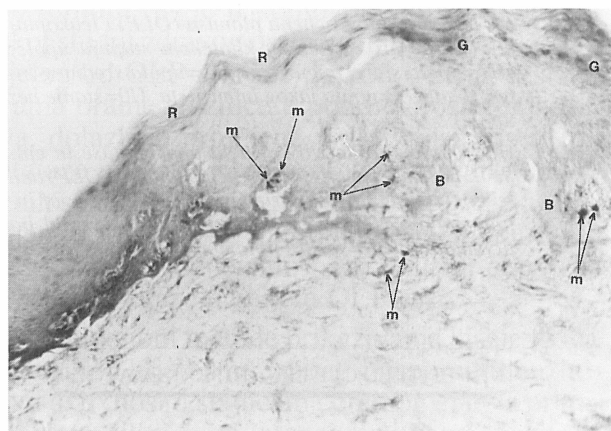
Slika 2. Aktivnost kisele fosfataze (KF) u epitelnim stanicama lezija oralnog lichen planusa (OLP) i leukoplakije (LPL) pri različitim kliničkim stupnjevima hiperkeratoze; (H1=hiperkeratoza slaba intenziteta, H2=hiperkeratoza srednjeg intenziteta, H3=hiperkeratoza jakog intenziteta).

Figure 2. Histoenzymatic activity of acid phosphatase in epithelial cells in lesions of oral lichen planus (OLP) and leukoplakia (LPL) in various clinical degrees of hyperkeratosis; (H1=weak hyperkeratosis, H2=mild hyperkeratosis, H3=severe hyperkeratosis).

žiteta upale učestalost obilježenih stanica u slučaju OLP-a naglo opada, dok je kod LPL-a nepromijenjena. U upali jakog intenziteta aktivnost kisele fosfataze istaknuta je samo u manjem broju epitelnih stanica kod OLP-a, dok kod LPL-a potpuno izostaje ($P=0,0236$).

Učestalost obilježenih stanica u hiperkeratozi kod OLP-a slična je nalazu u upali, ali je obrnuto proporcionalna nalazu kod LPL-a ($P=0,0834$) (slika 2). Pri jačem stupnju keratoze učestalost obilježenih stanica kod OLP-a opada, a kod LPL-a je najveća.

Analiza intenziteta aktivnosti KF-a u epitelnim stanicama kod OLP-a pokazala je sljedeće (slika 3): lizosomalni tip reakcije slaba intenzi-

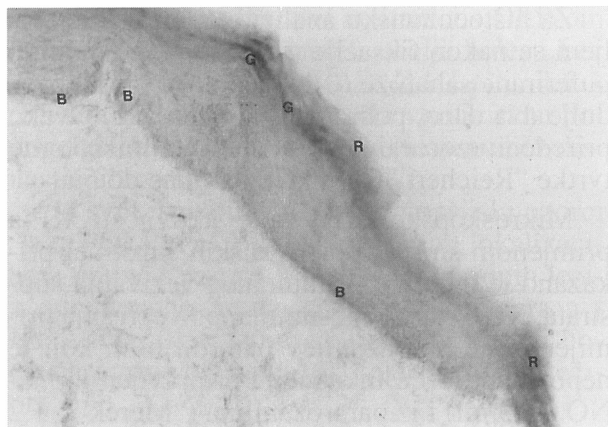


Slika 3. OLP. Istaknuta reakcija kisele fosfataze (KF) u rožnatom (R) i intenzivnije u granularnom sloju (G). Intenzivna reakcija KF-a vidljiva je u subepitelnim makrofagima (m) raspoređenim oko vakuolarno degeneriranih stanica bazalnog sloja (vd). U ostalim bazalnim stanicama (B) reakcija KF-a je negativna. (Povećanje x 100)

Figure 3. OLP. The activity of acid phosphatase is increased in the stratum corneum (R) and more intense in the stratum granulosum (G). An intense activity of acid phosphatase is also seen in the subepithelial and intraepithelial macrophages (m) distributed around the zones of vacuolar degenerated basal cells. There is no enzyme activity in basal cells. (Magnification, x 100).

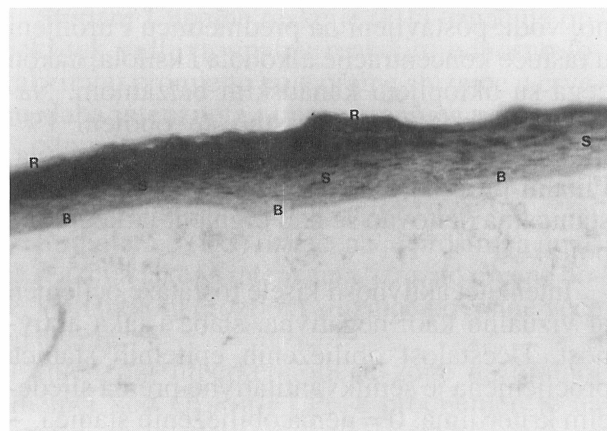
teta očitovao se u sloju roževine dok je u zrnatom sloju reakcija bila nešto intenzivnija. Jača aktivnost KF-a bila je istaknuta u malobrojnim intraepitelnim makrofagima, a izostala je u bazalnim stanicama kao i u zoni displazije u slučaju erozivnog lichen.

Kod LPL-a aktivnost enzima KF-a jakoga intenziteta bila je istaknuta u sloju roževine (slika 4) i osobito u zrnatom sloju epitela (lizozo-



Slika 4. LPL. Reakcija kisele fosfataze (KF) istaknuta je samo u roževini (R) i u zrnatom sloju (G), a posve izostaje u sloju bazalnih stanica (B). (Povećanje x 100)

Figure 4. LPL. A marked increase of acid phosphatase activity is seen in the stratum corneum (R) and particularly in the stratum granulosum (G). It is totally absent in the basal cells. (Magnification, x 100).



Slika 5. LPL. Intenzivna reakcija kisele fosfataze (KF) istaknuta u stanicama različitih slojeva epitela osim u bazalnom (B), gdje je negativna (x 100) (S=spinozni sloj)

Figure 5. LPL. An intense acid phosphatase activity is seen in the epithelial cells of various strata, except the basal cells (B) where it is negative. (x 100) (S=spinous layer).

malni tip reakcije) (slika 5). U bazalnom i sub-bazalnom području reakcija kisele fosfataze bila je potpuno negativna (slika 4 i 5).

Rasprava

Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da se učestalost obilježenih stanica s kiselim fosfatazom (KF) pri različitim kliničkom stupnju upalne reakcije i hiperkeratoze kod OLP-a značajno razlikuje u odnosu na nalaz kod LPL-a. Zajedno s uočenom razlikom u intenzitetu aktivnosti

KF-a u stanicama pojedinih slojeva epitela između lichen planusa i leukoplakije, to upućuje na nejednaku enzimsku aktivnost u njima. Tendencija pada učestalosti obilježenih stanica s KF-om s porastom kliničkog stupnja upalne reakcije kod OLP-a u skladu je s ranijim zapažanjima (8). Kod OLP-a u žarištima oštećenja tkiva u epitelnim stanicama opažene su promjene u permeabilnosti lizosomalne membrane, što neizbježno vodi u promjenu enzimске aktivnosti epitelne stanice narušavajući proces njezinoga sazrijevanja. Naše ispitivanje pokazalo je najmanju učestalost obilježenih stanica s KF-om upravo pri jakoj upali koju iz kliničkog iskustva prati gotovo uvijek i oštećenje epitela uz pojavu erozija. Kako su erozije kod OLP-a, praćene jakom upalnom reakcijom, ujedno i najčešće lezije koje mogu imati premaligni potencijal (9), od interesa je nalaz ove studije da je aktivnost KF-a u epitelu bila u trećini slučajeva erozivnog lichen negativna, a nije registrirana niti u slučaju displazije. Negativna aktivnost KF-a zapažena je i kod LPL-a praćenog jakom upalom.

Nalaz aktivnosti KF-a u epitelnim stanicama pri različitom intenzitetu hiperkeratoze između OLP-a i LPL-a oprečan je od nalaza u slučaju upale. Veća učestalost obilježenih stanica kod jačeg intenziteta hiperkeratoze u slučaju leukoplakije, za razliku od OLP-a gdje je učestalost obilježenih stanica kod jakog intenziteta hiperkeratoze najmanja, očito diferencira patogenezu hiperkeratotičnog procesa kod tih bolesti.

Upalna reakcija ističe se kao dominantna

komponenta patološkog procesa kod OLP-a, dok je kod LPL-a intenzivnija reakcija KF-a u stanicama zrnatog sloja epitela, što rezultira hiperkeratozom.

Negativna aktivnost kisele fosfataze u bazalnim i spinoznim stanicama oralnog epitela, nađena u lezijama OLP-a, u skladu je s ranijim istraživanjima (4), ali nije opisana za LPL. Potpunu odsutnost aktivnosti KF-a u bazalnim i spinoznim stanicama u usporedbi s nalazima smanjene aktivnosti (8) moguće je objasniti intenzivnijim patološkim procesom s jačim oštećenjem epitelnih bazalnih i spinoznih stanica, što je posljedica poremećenog metabolizma u njima (4), odnosno morfoloških i funkcionalnih promjena u lizosomima (8). Tome govori u prilog i nalaz aktivnosti KF-a kod jakog stupnja upale, gdje se učestalost obilježenih epitelnih stanica naglo smanjuje.

Zaključak

Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da su učestalost aktivnosti i intenzitet reakcije KF-a u stanicama pojedinih slojeva epitela kod OLP-a i LPL-a važni parametri u procjeni razvoja bolesti. Također je dijagnostički vrijedan pokazatelj i tendencija pada aktivnosti KF-a u epitelnim stanicama kod OLP-a pri jačem kliničkom stupnju upale i hiperkeratoze. Nasuprot tome, kod LPL-a je uočena tendencija jače aktivnosti kisele fosfataze pri jačem stupnju hiperkeratoze.

CHANGES OF ACID PHOSPHATASE (AP) ACTIVITY IN VARIOUS CLINICAL STAGES OF ORAL LICHEN PLANUS.

I. CHANGES OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN EPITHELIAL CELLS

Summary

Thirty-three biopsy samples of oral lichen planus (OLP) and 18 of leukoplakia (LPL) were examined by enzyme histochemistry to determine acid phosphatase activity in epithelial cells in

Adresa za korespondenciju:
Address for correspondence:

various clinical stages of inflammation and hyperkeratosis in the two diseases. Significantly more activated epithelial cells, as indicated by their intense reaction to acid phosphatase (AP), were found in inflammation in OLP than in LPL ($p=0.02$). In severe inflammation, a decreased activity of acid phosphatase was observed in epithelial cells from both OLP and LPL samples. The AP activity reaction was most pronounced in comeal and granular epithelial cells, especially in LPL, while it was negative in basal cells of both diseases. The frequency of AP-marked cells in various clinical stages of hyperkeratosis in OLP was almost identical to that in inflammation, but opposite to the finding in LPL. These findings suggested different epithelial cell metabolism in the same pathologic process, inflammation or hyperkeratosis, of clinically similar diseases, which may have a diagnostic and prognostic value.

Key words: oral lichen planus, leukoplakia, oral epithelium, histochemistry, acid phosphatase

Dr. sc. Marinka Mravak-Stipetić
Zavod za bolesti usta
Stomatološkog fakulteta
u Zagrebu
Gundulićeva 5
10000 Zagreb, Hrvatska

Literatura

- MUELLER J, BRUN DEL RE G, BUERKI H, KELLER H-W, HESS M W, COTTIER H. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol* 1975; 5:270-4.
- KNOWLES D M, HOFFMAN T, FERRARINI M, KUNKEL H G. The demonstration of acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes. Usefulness as a T cell marker. *Cell Immunol* 1978; 35:112.
- DAVEY F R, DOCK N L, McCALLUM J. Cytochemical reactions in resting and activated T lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 1980; 74:174-9.
- HEYDEN G, ARWILL T, GISSLEN H. Histochemical studies on oral lichen planus. *Oral Surg* 1974; 37(2):239-48.
- DOCKRELL H M, GREENSPAN J S. Histochemical identification of T cells in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979; 48:42-6.
- PANTALONE R M, PAGE R C. Lymphokine-induced production and release of lysosomal enzymes by macrophages. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1975; 72:2091.
- CHARON J, TOTO P D, GARGIULO A W. Activated macrophages in human periodontitis. *J Periodontol* 1981; 52:328-35.
- RAIKHLIN A N. Electron microscopic and histochemical research on lysosomes and acid phosphatase of epithelial cells of the normal oral mucosa and in lichen ruber planus. *Vestn Dermatol Venerol* 1985; 1:13-7.
- WHO. Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46(4):518-39.
- ANDREASEN J O. Oral lichen planus. II. A histologic evaluation of ninety-seven causes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968; 25:158.
- KROGH P, HOLMSTRUP P, THORN J J et al. Yeast species and biotypes associated with oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63:48-54.
- KRUTCHKOFF D J, EISENBERG E. Lichenoid dysplasia. A distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 30:308-15.
- MRAVAK-STIPETIĆ M, CEKIĆ-ARAMBAŠIN A, PIRKIĆ A, DOBRENIĆ M, STIPETIĆ D. Tendencije nekih histopatoloških promjena pri različitim kliničkim slikama oralnog lichenusa. *Acta Stomatol Croat* 1994; 28(2):113-20.
- WHO. Guide to epidemiology and diagnosis of oral mucosal diseases and conditions. Topographical classification of oral mucosa after Roed-Petersen, Roenstrup. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1980; 8:1-26.
- MRAVAK-STIPETIĆ M, CEKIĆ-ARAMBAŠIN A, PIRKIĆ A. Patohistološki i morfometrijski parametri u procjeni oralnog lichenusa rubera. *Acta Stomatol Croat* 1992; 26(3):175-81.