

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

II. Promjene aktivnosti kisele fosfataze u subepitelnom mononuklearnom staničnom infiltratu

Changes of Acid Phosphatase Activity in Various Clinical Stages of Oral Lichen Planus. II. Changes of Acid Phosphatase Activity in Subepithelial Mononuclear Cell Infiltrate

Sažetak

Na 33 biopsijska uzorka s lezija oralnog lichen planusa (OLP) i 18 s leukoplakijom (LPL) provedeno je ispitivanje histoenzimske aktivnosti kisele fosfataze (KF) u stanicama mononuklearnog staničnog infiltrata (MSI). Visoka razina aktivnosti KF-a zabilježena je u svim stanicama MSI kod OLP-a, podjednako kod upalne reakcije kao i kod hiperkeratoze. Kod LPL-a zabilježena je smanjena učestalost obilježenih stanica, limfocita i makrofaga, a obilježeni dendrični makrofagi u upali nisu nađeni. Aktivnost KF-a bila je istaknuta kod OLP-a u svim stanicama MSI različito distribuiranim (linearno subepitelno i u žarištima dublje u lamini propriji) ovisno o razvojnom stupnju lezije, što kod LPL-a nije zabilježeno. Zanimljiva je pojava obilježenih dendričnih makrofaga pri jačem orožnjenju leukoplakične lezije nasuprot nalazu kod OLP-a, što upućuje na različitu patogenezu procesa orožnjenja kod ispitanih bolesti. Različita distribucija stanica MSI i histoenzimska aktivnost kisele fosfataze pokazatelji su njihove različite uloge u patogenezi OLP-a i LPL-a.

Ključne riječi: oralni lichen ruber planus, leukoplakija, subepitelni mononuklearni stanični infiltrat, histokemija, kiselina 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; 30:97—103

IZVORNI
ZNAKSTVENI RAD

Primljeno: 20. ožujka 1995.
Received: March 20, 1995.

Uvod

Karakterističan histološki nalaz oralnog lichen planusa (OLP) uključuje uz ostalo i subepitelni mononuklearni stanični infiltrat dominantno sastavljen od T-limfocita, makrofaga i dendritičnih makrofaga odnosno Langerhansovih stanica (1—3). Suradnja između stanica koje prikazuju antigen (Langerhansove stanice) i T limfocita značajna je za pokretanje lokalne celularne imunološke reakcije u patogenezi OLP-a (4, 5).

Identifikacija pojedinačnih stanica MSI u tkivu usavršena je metodama histokemije i imunocitokemije, a suvremene studije pokazale su da postoje razlike u sastavu MSI između OLP-a i klinički sličnih bolesti (6, 7). Sastav MSI kod OLP-a mijenja se i u svezi s duljinom trajanja bolesti (8) i različitom vrstom terapije (9, 10). Dockrell i Greenspan (11) su ispitivanjem aktivnosti kisele fosfataze i nespecifične esteraze u upalnom infiltratu OLP-a našli da je lizosomska aktivnost tih hidrolaza bila istaknuta u većini subbazalnih limfocita. Različit intenzitet bojenja na kiselu fosfatazu i nespecifične esteraze, koji se očitovao u T-limfocitima, upućivao je na njihovu različitu funkcionalnu aktivnost. Nađen je i mali broj limfocita koji je pokazao negativnu aktivnost enzima. Makrofagi koji su nađeni u većem broju u upalnom infiltratu pokazivali su jači intenzitet bojenja finalnog produkta reakcije. Da je aktivnost hidrolitičkih enzima u makrofagima i u T-limfocitima odraz njihova funkcionalnog stanja, također su zapazili Pantalone i Page u reakcijama lizosomskih hidrolaza alfa naftil acetat esteraze (ANAE) i kisele fosfataze (KF) (12). Radi praćenja lokalne tkivne reakcije u lezijama OLP-a, htjeli smo primjenom histoenzimske metode obilježavanja stanica kiselom fosfatazom (KF) ispitati da li postoje razlike u aktivnosti stanica MSI obilježenih KF-om s obzirom na tip i topografiju pri različitom kliničkom stupnju upalne reakcije i hiperkeratoze u lezijama OLP-a u odnosu na leukoplakiju (LPL) te mogu li dobiveni rezultati, temeljeni na analizi uočenog tipa i topografije obilježenih stanica, biti pokazatelji stanja i mogućeg razvoja tih dviju klinički sličnih bolesti.

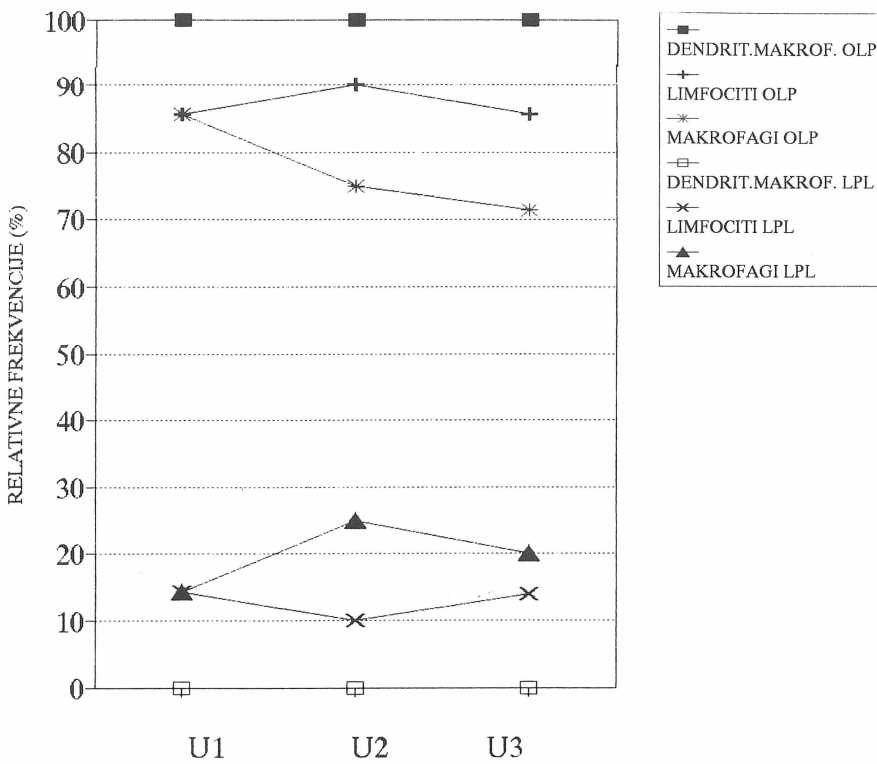
Ispitanici i postupci

Biopsijski uzorci uzeti su kod 33 ispitanika s OLP-om i 18 s LPL-om i nakon fiksacije obra-

đeni metodama histologije (radi potvrde kliničke dijagnoze) i enzimske histokemije primjenom enzima kisele fosfataze prema prije opisanim metodama (13—15). Finalni produkt enzimske reakcije očitovao se u obilježenim stanicama kao pigment jarkocrvene boje čiji je intenzitet ocijenjen vizualno kao negativna (—), slaba (*) i jaka aktivnost KF-a (**). Učestalost obilježenih stanica MSI s KF-om procijenjena je semikvantitativno prema sljedećim kriterijima: 0 = nema obilježenih stanica MSI, + = oskudan nalaz obilježenih stanica MSI, ++ = umjereno povećan nalaz obilježenih stanica MSI, +++ = nalaz gustih infiltrata obilježenih stanica MSI. Klinička registracija stupnja upalne reakcije i hiperkeratoze kod obje bolesti izvršena je tijekom oralnog pregleda i ocijenjena na način kako je opisano (15). Značajnost razlika u učestalosti obilježenih stanica MSI pri različitom kliničkom stupnju upalne reakcije između OLP-a i kontrolne grupe LPL-a procijenjena je hi-kvadrat testom, uz stupanj značajnosti od 5%.

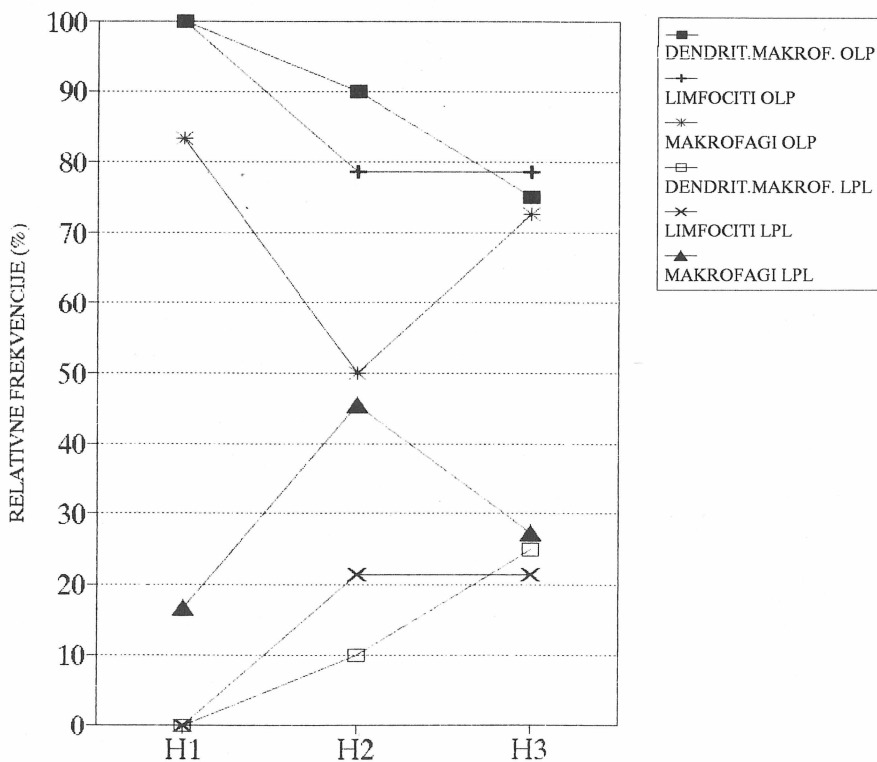
Rezultati

Dobiveni rezultati aktivnosti KF-a u MSI u upali kod OLP-a i LPL-a prikazani su grafički na slici 1. Na ordinati je naznačen postotak aktivnih KF stanica, a na apscisi klinički stupnjevi upale. Vidljivo je da je aktivnost stanica između OLP-a i LPL-a različita: kod OLP-a je razina aktivnosti stanica visoka (između 75% i 100% svih stanica), dok je kod LPL-a niska (između 0 i 25% zastupljenosti svih stanica). Značajne razlike dobivene su u učestalosti obilježenih limfocita ($P=0,02$), makrofaga ($P=0,05$) i dendritičnih makrofaga ($P=0,001$), a opažen je i jači intenzitet finalnog produkta reakcije KF-a u tim stanicama kod OLP-a u odnosu na kontrolni LPL. Intenzivna reakcija KF-a opažena je u limfocitima i makrofagima raspoređenim neposredno ispod bazalne membrane u lezijama OLP-a (slika 3) što kod LPL-a nije zabilježeno (slika 4). S porastom intenziteta upale u lezijama OLP-a smanjuje se učestalost obilježenih stanica, limfocita, makrofaga i dendritičnih makrofaga. Kod jakog stupnja upale nađene su u lamini proprije folikuloidne nakupine limfocita T blisko okružene makrofagima koji su pokazivali jači intenzitet reakcije kisele fosfataze (slika 5). Dendritični makrofagi nađeni u limfoidnim žarištima lamine proprije OLP-a selektivno su pokazivali jači intenzitet reakcije KF-a



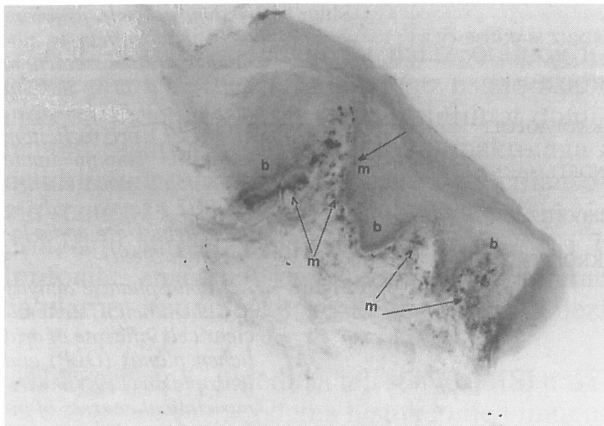
Slika 1. Aktivnost kisele fosfataze (KF) u subepitelnom mononuklearnom staničnom infiltratu oralnog lichen planusa (OLP) i leukoplakije (LPL) pri različitim kliničkom stupnju upale (U1=upala slaba intenziteta, U2 = upala srednjeg intenziteta, U3 = upala jakog intenziteta)

Figure 1. Acid phosphatase activity in subepithelial mononuclear cell infiltrate of oral lichen planus (OLP) and leukoplakia (LPL) in various clinical degrees of inflammation (U1 = weak inflammation, U2 = mild inflammation, U3 = severe inflammation).



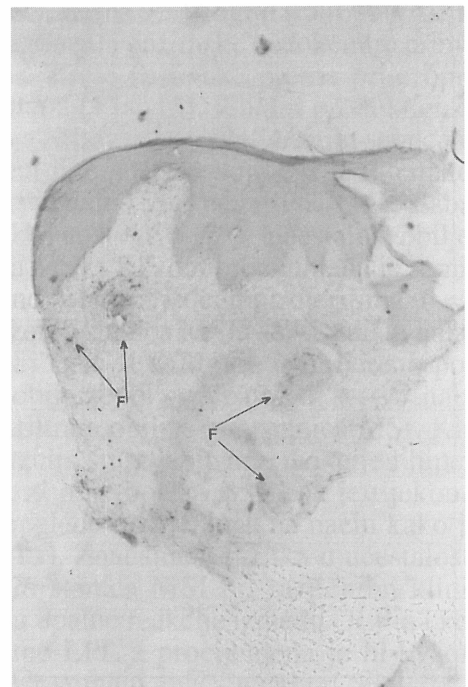
Slika 2. Aktivnost kisele fosfataze (KF) u subepitelnom mononuklearnom staničnom infiltratu oralnog lichen planusa (OLP) i leukoplakije (LPL) pri različitim kliničkom stupnju hiperkeratoze (H1 = hiperkeratoza slaba intenziteta, H2 = hiperkeratoza srednjeg intenziteta, H3 = hiperkeratoza jakog intenziteta).

Figure 2. Acid phosphatase in subepithelial mononuclear cell infiltrate of oral lichen planus (OLP) and leukoplakia (LPL) in various clinical degrees of hyperkeratosis (H1 = weak hyperkeratosis, H2 = mild hyperkeratosis, H3 = severe hyperkeratosis).



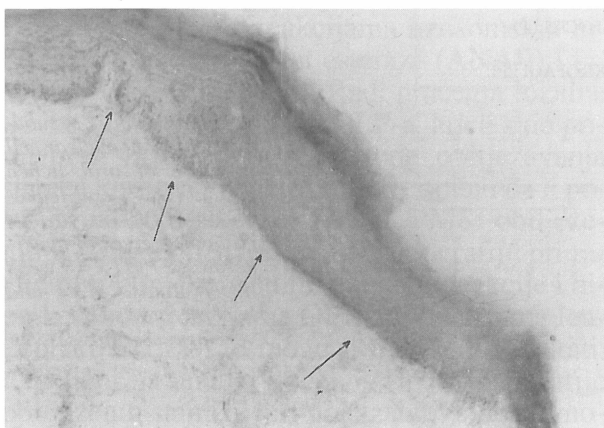
Slika 3. OLP. Istaknuta reakcija kisele fosfataze (KF) u sub-epitelnim makrofagima (m) distribuiranim neposredno i kontinuirano ispod bazalne membrane. Pojedinačni obilježeni makrofagi vidljivi u epitelu (m — strjelica!). U epitelnim stanicama (b) reakcija kisele fosfataze je negativna. (KF + kontrastno bojenje metilnim zelenilom, lupa)

Figure 3. OLP. Intense activity of acid phosphatase in the sub-epithelial macrophages (m) distributed immediately and continuously under the basal lamina and in single macrophages seen in the epithelium (m — arrow!). There is no enzyme activity in basal cells (b). (Acid phosphatase + contrast methyl green stain, magnifying glass)



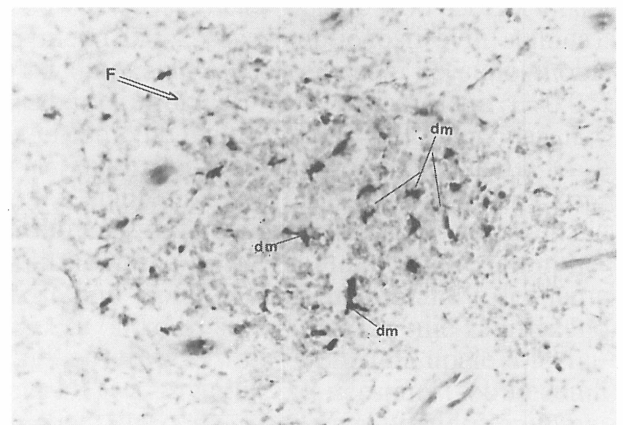
Slika 5. OLP. Žarišna nakupina mononuklearnih stanica u lamini propriji. Obilježeni su makrofagi i limfociti T (KF + kontrastno bojenje metilnim zelenilom, povećanje x 100)

Figure 5. OLP. Focal infiltrate of mononuclear cells in lamina propria. Acid phosphatase activity is visible in macrophages and lymphocytes (Acid phosphatase + methyl green stain x 100)



Slika 4. LPL. Odsutnost obilježenih makrofaga u lamini propriji (strjelice!) (KF + kontrastno bojenje metilnim zelenilom, x 100)

Figure 4. LPL. Absence of stained macrophages in lamina propria (arrows!) (Acid phosphatase + methyl green stain magnification, x 100)



Slika 6. OLP. Žarišna nakupina mononuklearnih stanica (F) dublje u lamini propriji s istaknutim dendritičnim makrofagima (dm). KF + kontrastno bojenje metilnim zelenilom, x 200

Figure 6. OLP. Focal infiltrate of mononuclear cells (F) with intense acid phosphatase activity in dendritic macrophages (dm). Acid phosphatase + methyl green stain, x 200

(slika 6). S porastom intenziteta upale njihova je učestalost kod OLP-a opadala, a kod LPL-a obilježeni dendritični makrofagi nisu nađeni. Na slici 2 grafički je prikazana učestalost obilježenih stanica MSI pri različitom kliničkom stupnju orožnjenja. Učestalost obilježenih stanica veća je kod OLP-a u odnosu na LPL. Međutim, opaža se pad aktivnosti KF-a u svim stanicama MSI kod OLP-a za razliku od nalaza kod LPL-a, gdje se uočava tendencija većoj učestalosti aktivnih stanica kod jačeg orožnjenja, ali te razlike nisu statistički značajne. Kod LPL-a nađeni su obilježeni dendritični makrofagi u lamini propriji pri jačem stupnju orožnjenja što je suprotno nalazu u upali.

Rasprava

Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da je histoenzimska aktivnost kisele fosfataze u mononuklearnim stanicama kod OLP-a i LPL-a u određenoj korelaciji s kliničkim stanjem i intenzitetom bolesti. Kod OLP-a s jačom upalnom reakcijom učestalost obilježenih stanica se općenito smanjuje, što je pokazano kroz smanjenu aktivnost u njima. Jači intenzitet finalnog produkta reakcije u limfocitima, makrofagima i dendritičnim makrofagima kod OLP-a, za razliku od LPL-a, pokazuje pak jaču metaboličku reakciju u njima i ističe njihovu različitu funkciju u razvoju bolesti. Uz to i različita distribucija pojedinih mononuklearnih stanica ima funkcionalno značenje, što je poznato iz novijih imunoloških studija OLP-a (8, 16, 17). Aktivnost KF-a zabilježena je u limfocitima i makrofagima lamine proprije u obje bolesti, ali je značajna razlika u tome što je kod OLP-a reakcija kisele fosfataze bila mnogo intenzivnija, osobito u limfocitima i makrofagima subbazalnog područja, što kod LPL-a nije zabilježeno. Subbazalno raspoređeni T-limfociti kod OLP-a pokazuju različit stupanj aktivacije nakon stimulacije specifičnim antigenom (17, 19, 20) pa i jača reakcija KF-a u tim stanicama može govoriti o njihovoj aktivaciji. Jači intenzitet aktivnosti KF-a u subbazalno raspoređenim makrofagima pokazatelj je stupnja njihove diferencijacije i aktivnosti. Aktivacija makrofaga u upali kod OLP-a izazvana je produkcijom limfokina iz aktiviranih limfocita, ali i samih aktiviranih makrofaga, na što upućuju istraživanja Pantalone i Page (12). To rezultira većom produkcijom lizozomalnih enzima, čime makrofagi sudjeluju u

destrukciji epitelnih stanica i samih mononukle-ara koji aktivno sudjeluju u patološkom procesu. Time se može objasniti pad učestalosti limfocita i makrofaga obilježenih KF-om kod OLP-a s intenzivnom upalnom reakcijom. Značajne razlike u učestalosti obilježenih dendritičnih makrofaga između OLP-a i LPL-a, koje se očituju u upalnoj reakciji, mogu se protumačiti činjenicom da su dendritični makrofagi općenito brojniji kod OLP-a (21) i kao nositelji informacije o antigenu glavni pokretači celularne imunološke reakcije, nasuprot LPL-u koji nema takvu patogenezu (21, 23). Naši rezultati pokazali su razlike u aktivnosti kisele fosfataze u stanicama mononuklearnog infiltrata pri različitom stupnju orožnjenja. Važan je podatak da se obilježeni dendritični makrofagi kod LPL-a u većem broju očituju kod jače keratinizirane leukoplakične lezije. Ranije imunohistokemijske studije pokazale su da je broj dendritičnih makrofaga u sluznici obrnuto proporcionalan stupnju keratinizacije kao i da postoje regionalne varijacije u broju i distribuciji tih stanica (22). Lokalna odsutnost tih stanica u tkivu može oštetiti imunološku zaštitu i pridonijeti razvoju bolesti, ali je isto tako povećan broj dendritičnih makrofaga nađen u slučaju oralnog karcinoma (24). Iako su svi biopsijski uzorci uzeti s različitih dijelova nekeratinizirane oralne sluznice, različita učestalost obilježenih KF-om dendritičnih makrofaga kod ispitanih bolesti diferencira njihovu ulogu u procesu orožnjenja kod OLP-a i LPL-a. Nalaz smanjene učestalosti obilježenih dendritičnih makrofaga kod OLP-a u skladu je sa zapažanjima da se njihov broj smanjuje u jače keratiniziranoj sluznici i u remisiji bolesti (4). Kod LPL-a veća učestalost KF aktivnih stanica kod jačeg stupnja orožnjenja i nalaz intenzivne reakcije kisele fosfataze u epitelnim stanicama zrnatog i rožnatog sloja (15) pretpostavlja da je patološki proces kod LPL-a primarno u epitelu.

Zaključak

Provedeno ispitivanje pokazuje da su leukoplakija i lichen ruber planus bolesti različitih patogenetskih obilježja koja se očituju u različitoj histoenzimskoj aktivnosti KF-a u stanicama mononuklearnog infiltrata. Pri tome su intenzitet aktivnosti KF-a u pojedinim mononuklearnim stanicama i distribucija obilježenih stanica od osobitoga dijagnostičkog značenja.

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

II. CHANGES OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN SUBEPITHELIAL MONONUCLEAR CELL INFILTRATE

Adresa za korespondenciju:
Address for correspondence:

Summary

Thirty-three biopsy specimens from lesions of oral lichen planus (OLP) and 18 from leukoplakia (LPL) were examined for the study of acid phosphatase activity in subepithelial mononuclear cell infiltrate (MCI). Results showed a high level of activity in all mononuclear cells of OLP in inflammation as well as in hyperkeratosis. In LPL, a decrease in both the number of active lymphocytes and number of active macrophages was observed in inflammation, while active dendritic macrophages were not found. Acid phosphatase activity was expressed in all mononuclear cells of OLP, distributed sub-basally and in focal accumulations deeper in lamina propria, depending on the evolutionary stage of the disease, which was not observed in LPL. Interesting was the finding of active dendritic macrophages in moderate and severe hyperkeratosis in LPL, contrary to the finding in OLP. This suggested different pathogenesis of hyperkeratotic process in the two diseases. Different distribution and histoenzymatic activity in mononuclear cells of the examined lesions provided a more detailed insight into their role and differences in the pathogenesis of OLP and LPL.

Key words: oral lichen planus, leukoplakia, subepithelial mononuclear cell infiltrate, enzyme histochemistry, acid phosphatase

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

Literatura

1. URBIZO-VELEZ J, RODRIGUEZ PEREZ I, ALBRECHT M, BANOCZY J. Comparative histopathological studies in oral lichen planus. *Acta Morphol Hung* 1990; 31(1):71-81.
2. McCLATCHEY D K, SILVERMAN S, HANSEN L S. Studies on oral lichen planus. III. Clinical and histologic correlations in 213 patients. *Oral Surg* 1975; 39(1):122-9.
3. RAGAZ A, ACKERMAN B A. Evolution, maturation and regression of lesions of lichen planus. New observations and correlations of clinical and histologic findings. *Am J Dermatopathol* 1981; 3(1):5-25.
4. JUNGELL P. Oral lichen planus. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991; 20:129-35.
5. SCULLY C, EL-KOM M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol* 1985; 14:431-58.
6. KILPI A. Characterization of mononuclear cells of inflammatory infiltrates in oral tissues. A histochemical and immunohistochemical study of labial salivary glands in Sjogren's syndrome and of oral lesions in systemic lupus erythematosus and in lichen planus. *Proc Finn Dent Soc* 1988; 84 (Suppl 3):1-93.
7. BJERCKE J. Subpopulations of mononuclear cells in lesions of psoriasis, lichen planus, and discoid lupus erythematosus studied using monoclonal antibodies. *Acta Dermatol Stockh* 1982; 62:477-83.
8. HIROTA J, YONEDA K, OSAKI T. Destruction of basement membrane and cell infiltrates in oral lichen planus. *Path Res Pract* 1989; 185:218-24.
9. BAUDET-POMMEL M, JANIN-MERCIER A, SOUTEYRAND P. Sequential immunopathologic study of oral lichen planus treated tretinoin and etretinate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71:197-202.
10. MOZZANICA N, CATTANEO A, LEGORI A, PIGATO P, FINZI A F. Immunohistologic evaluation of the effect of cyclosporine treatment on the lichen planus immune infiltrate. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24:550-4.
11. 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.

12. PANTALONE R M, PAGE R C. Lymphokine-induced production and release of lysosomal enzymes by macrophages. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1975; 72:2091.
13. MRAVAK-STIPETIĆ M, CEKIĆ-ARAMBAŠIN A, PIRKIĆ A. Histopathologic and morphometric parameters in the assessment of Oral Lichen Planus. *Acta Stomatol Croat* 1992; 26(3):175-81.
14. MRAVAK-STIPETIĆ M, CEKIĆ-ARAMBAŠIN A, PIRKIĆ A, DOBRENIC M, STIPETIĆ D. Tendencies of some histopathological changes in various clinical forms of Oral Lichen Planus. *Acta Stomatol Croat* 1994; 28(2):113-20.
15. MRAVAK-STIPETIĆ M, PIRKIĆ A, DOBRENIC M, CEKIĆ-ARAMBAŠIN A. The changes of acid phosphatase activity in epithelial cells of Oral Lichen Planus. Part I. *Acta Stomatol Croat* 1995 (in press).
16. TAKEUCHI Y, TOHNAI I, KANEDA T, NAGURA H. Immunohistochemical analysis of cells in mucosal lesions of oral lichen planus. *J Oral Pathol* 1988; 17:367-73.
17. ANDRE J, LAPORTE M, DELAVAUULT P. Lichen plan; étiopathogénie. *Acta Stomatol Belg* 1990; 87(4):229-31.
18. ASHMAN R F. Lymphocyte activation. U: Paul W E. *Fundamental immunology*. New York: Raven Press, 1984; 256-300.
19. KILPI A M. Activation marker analysis of mononuclear cell infiltrates of oral lichen planus in situ. *Scand J Dent Res* 1987; 95:174-80.
20. PARODI A, CARDO P P. Patients with erosive lichen planus may have antibodies directed to a nuclear antigen of epithelial cells: A study on the antigen nature. *J Invest Dermatol* 1990; 94:689-93.
21. RICH A M, READE P C. A quantitative assessment of Langerhans cells in oral mucosal lichen planus and leukoplakia. *Brit J Dermatol* 1989; 120:223-8.
22. DANIELS T E. Human mucosal Langerhans cells: postmortem identification of regional variations in oral mucosa. *J Invest Dermatol* 1984; 82:21-4.
23. BOISNIC S, FRANCES C, BRANCHET M-C, SZPIRGLAS H, CHARPENTIER Y L. Immunohistochemical study of oral lesions of lichen planus: diagnostic and pathophysiologic aspects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70:462-5.
24. McARDLE P J, KNIGHT B A, HALLIDAY G M, MULLER H K, ROWDEN G. Quantitative assessment of Langerhans cells in actinic keratosis, Bowen's disease, keratoacanthoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *Pathology* 1986; 18:212-6.