

Zur Ultrastruktur der Haarleukoplakie*

X. Zhang¹, A. Langford¹, H. Gelderblom² und P. Reichart¹

¹ Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie/Oralchirurgie (Leiter: Prof. Dr. P. Reichart) der Freien Universität Berlin

² Abteilung für Virologie (Komm. Leiter: Dr. H. Gelderblom), Robert-Koch Institut des Bundesgesundheitsamtes

3 Biopsien von Veränderungen, die klinisch einer Haarleukoplakie (HL) entsprachen und bei homosexuellen Männern mit dem Vollbild von AIDS auftraten, wurden histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Lichtmikroskopisch fanden sich die typischen Charakteristika der HL in Form von Keratinfortsätzen über einem verdickten Stratum corneum, einer Verbreiterung des Stratum spinosum und dem Auftreten von ballonartig aufgetriebenen Keratinozyten. Elektronenmikroskopisch ließen sich Partikel der Herpes-Virus-Gruppe, vor allem im oberen Epitheldrittel, nachweisen. In ballonierten Epithelzellen wurden darüber hinaus spezielle tubulo-retikuläre Strukturen sowie charakteristische Membrankonfigurationen nachgewiesen. Die ultrastrukturellen Befunde sowie mögliche Pathomechanismen werden diskutiert.

1 Einleitung

Die orale »hairy leukoplakia« (HL) oder Haarleukoplakie wurde 1984 erstmalig in den USA beschrieben und als HIV-assoziierte Veränderung charakterisiert [7]. Die HL ist gekennzeichnet durch weiße, meist bilateral auftretende, nicht abwischbare Veränderungen am seitlichen Zungenrand. Die HL wurde zunächst hauptsächlich bei HIV-infizierten homosexuellen Männern beobachtet, später folgten Berichte über das Auftreten von HL bei heterosexuellen HIV-Infizierten, Hämophilen, Transfusionsempfängern [8, 19] sowie i.v.-Drogenabhängigen [17, 18]. Nach systemischer oder lokaler antimykotischer Therapie der oft mit der HL gleichzeitig vorkommenden *Candida albicans*-Infektion kommt es allgemein zum Verschwinden der Candidiasis, während die HL persistiert. Eine Überlebensanalyse zeigte,

daß die Wahrscheinlichkeit, das Vollbild von AIDS zu entwickeln, bei Patienten mit HL nach 16 Monaten 40% beträgt, nach 31 Monaten 83% [9].

Lichtmikroskopische Untersuchungen ergaben als morphologische Charakteristika die Verbreiterung des Stratum corneum (Hyperkeratose) mit Keratinfadenbildung, die Verbreiterung des Stratum spinosum (Akanthose), das Auftreten von balloniert erscheinenden Keratinozyten (Koilozytose) sowie fehlende Entzündungszeichen im subepithelialen Gewebe [4, 7, 10]. Elektronenmikroskopisch konnten Partikel der Herpes-Virus-Gruppe in der HL nachgewiesen werden [1, 7, 10, 12]. Immunzytochemisch wurden diese HL-assoziierten Herpes-Viren als Epstein-Barr-Viren (EBV) identifiziert [10, 20, 21]. Damit übereinstimmend gelang mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung der Nachweis von viraler EBV-DNA [14].

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ultrastrukturelle Befunde der Haarleukoplakie zu beschreiben und mögliche Pathomechanismen zu diskutieren.

2 Material und Methode

Bei 70 Patienten von insgesamt 242 untersuchten HIV-infizierten Patienten konnte eine HL beobachtet werden (Männer n = 66, Frauen n = 4; homo/bisexuell n = 60, i.v.-drogenabhängig n = 8, Bluttransfusionsempfänger n = 2). Das durchschnittliche Alter aller HL-Patienten betrug 34,2 Jahre. Zum Zeitpunkt der Diagnose der HL waren 5 seropositive Patienten klinisch asymptomatisch, 22 zeigten Symptome des Lymphadenopathiesyndroms bzw. des AIDS-related complex (ARC) und 43 das Vollbild der AIDS-Erkrankung. Für die vorliegende Studie wurde bei 3 männlichen Homosexuellen (Alter 39, 46 und 82) eine Biopsie der Haarleukoplakie vom Zungenrand in Lokalanästhesie (Ultracain DS®) entnommen. Um das gleichzeitige Vorliegen einer Candida-

* Unterstützt durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie (II-022-86)

albicans-Infektion im Bereich der HL auszuschließen, wurden diese Patienten vor Durchführung der Biopsie mit lokalen Antimykotika (3 Patienten, Mikonazol) bzw. mit systemischen Antimykotika (2 Patienten, Ketokonazol) therapiert. Ein Teil der Biopsien wurde für die Routinehistologie (H & E und PAS) aufbereitet. Für die Elektronenmikroskopie wurde das Gewebe in 2,5%igem Glutaraldehyd in PBS für 3 Std. fixiert und anschließend für 1 Std. in 1%igem OSO_4 nachfixiert. Die Proben wurden dann für 1 Std. mit 1%igem Uranylacetat behandelt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Epon 812. Semidünnschnitte von 0,5 oder 1 μm Dicke wurden mit Toluidinblau gefärbt. Ultradünnschnitte (40 bis 60 nm) wurden mit Bleicitrat nachkontrastiert und in einem Zeiss EM 10A bei 60 KV untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopie

Als gemeinsames histologisches Merkmal fanden sich in allen 3 Fällen ausgeprägte Keratinfortsätze über einer verbreiterten, lamellären und kernlosen Hornschicht (Hyperorthokeratose; Abb. 1). In allen 3 Biopsien war nur vereinzelt eine kernhaltige Hornschicht bei gleichzeitig fehlendem Stratum granulosum (Parakeratose) feststellbar. Das Stratum spinosum war auf 7 bis 10 Zellagen verbreitert (Akanthose). In den unteren Zellschichten des Stratum spinosum waren ein-

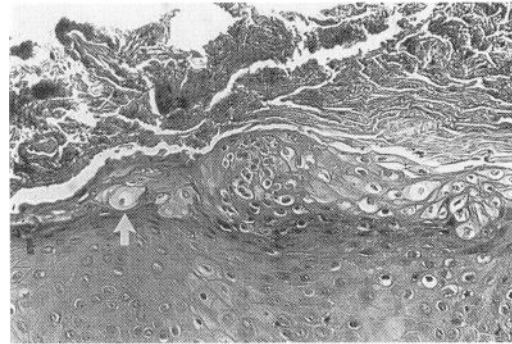


Abb. 1 Keratinfortsätze an der Epitheloberfläche (HL) mit parakeratotischer Keratinisierung. Intraepithelial sind einige Koilozyten (Pfeil) erkennbar, PAS, $\times 120$

zelne Keratinozyten ballonartig aufgetrieben, zeigten einen Verlust des typischen Chromatinstromas und wiesen teilweise basophile, intranukleäre Einschlüsse auf (Abb. 1). *Candida albicans* konnte in Epithelzellen oberflächlicher Schichten nachgewiesen werden. Weder im Epithel noch subepithelial bestand ein zelluläres Entzündungsinfiltrat.

3.2 Elektronenmikroskopie

In allen 3 Fällen konnten ballonartig aufgetriebene Keratinozyten speziell in der Stachelzellschicht des Epithels beobachtet werden. Diese Zellen waren vergrößert und enthielten nur wenige Organellen, wie degenerierte Mitochon-

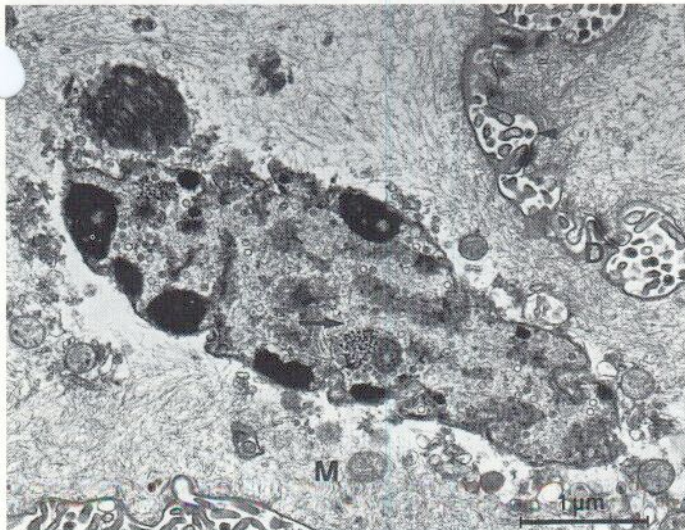


Abb. 2 Pyknotischer Zellkern einer koilozytotischen Zelle. Unmittelbar an der Kernmembran findet sich kondensiertes Chromatin mit einzelnen kreisrunden Defekten. Innerhalb des Nukleus sind EB-Nukleokapside (Pfeil) sowie im Zytoplasma komplette und im Extrazellularraum Hülle-tragende Viren (Pfeilkopf) erkennbar (M = Mitochondrien, D = Desmosomen), TEM, $\times 25000$

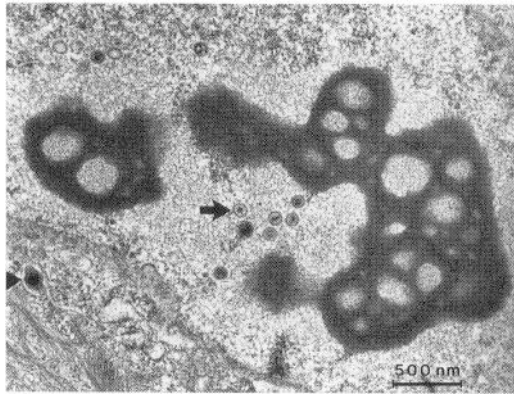


Abb. 3 Höhere Vergrößerung des Nukleus eines ballonartig aufgetriebenen Keratinozyten mit kondensiertem, randständigem Chromatin, das wie ausgestanzt erscheinende Defekte und EB-Virus Kapside (Pfeil) aufweist. Im Zytoplasma ist ein komplettes EB-Virus erkennbar (Pfeilkopf), TEM, $\times 36000$

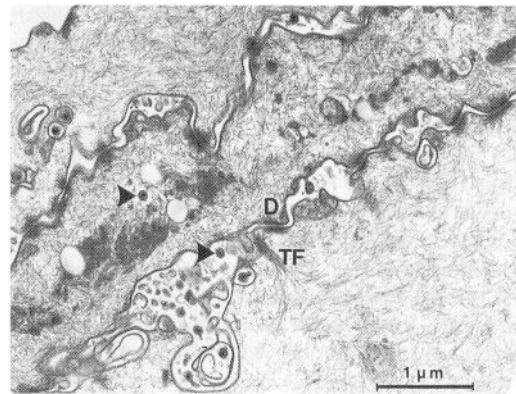


Abb. 5 EB-Virus im Zytoplasma sowie im Interzellularraum von koilozytischen Zellen des Stratum granulosum. Innerhalb des Zytoplasma finden sich Viruspartikel als freie Nukleokapside oder als komplette, Hülle-tragende Viren (Pfeilkopf), (TF = Tonofilamente, D = Desmosomen), TEM, $\times 25000$

drien und Keratinfibrillen. Pyknotische Nuklei zeigten kondensiertes Chromatin, das meist unmittelbar an der Kernmembran lag und wie ausgestanzt erscheinende Defekte aufwies (Abb. 2, 3). *Candida albicans* wurde häufig im Stratum corneum sowie in oberen Schichten des Stratum spinosum beobachtet (Abb. 4). Viruspartikel der Herpes-Virus-Gruppe konnten vor allem in der oberen Stachelzellschicht in und um koilozytische Zellen sowie in den Interzellular-

larräumen abgeflachter Epithelien oberflächlicher Zellagen beobachtet werden (Abb. 5 u. 6). Gelegentlich wurde das Virus auch in mit *Candida albicans* infizierten Zellen nachgewiesen. Einzelne Nuklei enthielten unterschiedliche Mengen von isometrischen Virusnukleokapsiden mit einem Durchmesser von etwa 100 nm. Während einige Kapside bereits die elektronendichte, toroidale, für Herpesviren typische Desoxyribonukleoproteinstruktur enthielten, bestanden andere

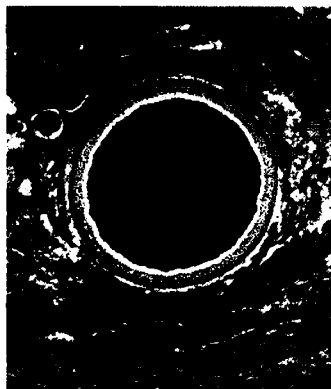


Abb. 4 *Candida albicans* im Zytoplasma einer Zelle des Stratum spinosum. Innerhalb der Candidahyphe sind der Zellkern und Mitochondrien erkennbar. Der zwischen Zellwand und Zytoplasma vorhandene elektronen-luzente Zwischenraum ist fixationsbedingt (D = Desmosomen), TEM, $\times 17000$

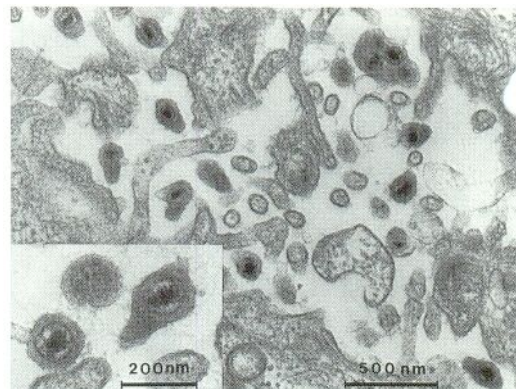


Abb. 6 Interzellularraum zwischen Keratinozyten des oberen Stratum granulosum mit kompletten Herpesvirusteilchen, die u. a. durch ihr elektronendichtes Desoxyribonukleoprotein gekennzeichnet sind. TEM, $\times 50000$. Ausschnittvergrößerung: komplette, Hülle-tragende EB-Viren, TEM, $\times 100000$

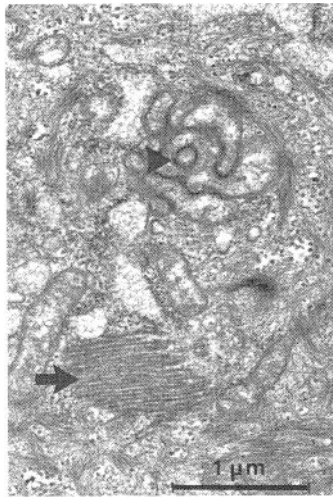


Abb. 7 Charakteristische zelluläre Differenzierungen im Zytoplasma eines Herpes-Viren produzierenden Keratinozyten: parallel angeordnete, tubuläre Strukturen (Pfeil) sowie undulierende Bestandteile einer teilweise fusionierten Lipid-Doppelmembran (Pfeilkopf), TEM, $\times 25000$

noch aus leeren Proteinkapsiden. Gelegentlich wurde auch die Ausschleusung von Herpes-Virus-Kapsiden aus Zellkernen beobachtet. Bei dieser Ausschleusung erhalten die Nukleokapside ihre zukünftige Virushülle im Rahmen des sogenannten »budding«-Prozesses. Innerhalb des Zytoplasmas konnten Viruspartikel als freie Nukleokapside oder – vor allem im endoplasmatischen Retikulum – als komplette, Hülle-tragende Partikel beobachtet werden. Reife, d. h. umhüllte Herpestypviren im Zytoplasma wie auch im Extrazellularraum zeigten identische Durchmesser von 150 nm.

Im Zytoplasma der Herpesvirus-produzierenden Koilozyten fanden sich darüber hinaus regelmäßig 2 weitere charakteristische, zelluläre Differenzierungen. Die eine bestand aus tubulären Strukturen, die meist in parallel und recht starr erscheinenden Bündeln angeordnet waren (Abb. 7). Der Durchmesser dieser Tubuli betrug 35 nm. Eine weitere Einschlußkörperstruktur war aus undulierenden Membranbestandteilen zusammengesetzt. Diese wurden hauptsächlich in der Nähe der Kerne koilozytischer Zellen beobachtet und bestanden aus je 2, teilweise fusionierten Lipid-Doppelmembranen. Die innere Schicht dieser Struktur war elektronendicht und wies eine Breite von 25 nm auf (Abb. 7). Veränderungen

der subepithelialen Basalmembran wurden nicht beobachtet.

4 Diskussion

Die mit der HIV-Infektion assoziierte HL wurde bisher, wie in unseren 3 Fällen, als eine ausschließlich enoral auftretende Veränderung beschrieben und ist möglicherweise als Frühzeichen der späteren AIDS-Manifestation zu werten [4, 20]. Das Auftreten der HL wurde bei HIV-infizierten Patienten aller Risikogruppen beschrieben [7, 17, 19].

Die HL kann speziell für den klinisch Unerfahrenen leicht mit einer Kandida-Infektion verwechselt werden, wie dies initial auch geschah. Ihr Fortbestehen trotz Antimykotika-Behandlung und die histologischen Befunde legten dann allerdings den Verdacht einer virusbedingten Genese nahe. In mehreren elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in HL-Biopsien übereinstimmend Viren vom Herpestyp entdeckt [7, 10, 12]. Darüber hinaus wurden in einigen dieser Untersuchungen auch humane Papillomvirus (HPV)-ähnliche Partikel beschrieben [7, 10]. Während Greenspan et al. [7, 10] über eine Doppelinfektion der HL mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV; nachgewiesen durch In-situ-Hybridisierung) und HPV (nachgewiesen durch Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie) berichteten, konnten wir in den vorliegenden Biopsien elektronenmikroskopisch kein HPV nachweisen. In einer weiteren Studie von 7 HL-Biopsien konnte durch In-situ-Hybridisierung mit HPV-Typ 6, 11, 13, 16, 18 Nukleinsäure-»probes« ebenfalls kein HPV-Nachweis geführt werden, dagegen enthielten 5 dieser Biopsien EBV-DNS [14]. Aufgrund der Beobachtung, daß HPV-Partikel elektronenmikroskopisch bei 25 Fällen von HL beobachtet werden konnten, nahmen Greenspan et al. 1984 [7] an, daß das gleichzeitige Auftreten von EBV und HPV möglicherweise nicht zufällig sei. Da HPV weder in den vorliegenden 3 Fällen noch in weiteren 7 Fällen [14] nachzuweisen war, unterstützen diese Befunde nicht das Konzept einer notwendigen EBV- und HPV-Doppelinfektion für das Entstehen der HL.

In verschiedenen Geweben von Patienten mit ARC oder AIDS wurden zytoplasmatische Einschlüsse beschrieben, die als vesikuläre Rosetten, »test-tube ring-shaped forms (TRF)« oder tubulo-retikuläre Strukturen (TRS) beschrieben

wurden [13, 16]. Im Zytoplasma EBV-produzierender Zellen konnten wir nur eine Form parallel angeordneter, rigide erscheinender Strukturen beobachten, die derjenigen entsprach, die 1986 von *Belton* und *Eversole* [2] beschrieben worden war.

Ursprung und Bedeutung dieser Strukturen sind unbekannt. Während das Auftreten der parallel orientierten, intrazytoplasmatischen tubulären Strukturen (Abb. 7) nur für die HL beschrieben ist, fanden sich »TRF-Einschlüsse« auch im Rahmen anderer immunologischer und neurodegenerativer Erkrankungen. Diese aus Membransystemen bestehenden Einschlüsse schienen mit der Produktion von Alpha- und Beta-interferon, nicht aber von Gamma-interferon assoziiert zu sein [16]. Das Auftreten dieser Aggregationen ist möglicherweise als Hinweis für eine Virus-induzierte Interferonproduktion zu werten.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten undulierenden Membranstrukturen im Zytoplasma koilozytotischer Zellen bestehen aus teilweise fusionierten Membranen, ähnlich wie die oben erwähnten TRF-TRS. Es ist möglich, daß diese Membrandifferenzierungen Vorstufen dieser TRF-TRS darstellen.

Wie auch in anderen Untersuchungen beobachtet [1], fand sich aufgrund der fehlenden zellulären Immunreaktion keine Abwehrreaktion gegenüber der *Candida-albicans*-Infektion. Zu dieser Energie könnten HIV-bedingte funktionelle Störungen der Antigen-Verarbeitung und -Präsentation durch Monozyten und Langerhans-Zellen sowie eine möglicherweise mangelnde Monozytenmigrationsfunktion beigetragen haben [1, 3]. Elektronenmikroskopische sowie immunhistochemische Befunde zeigen, daß das Auftreten von EBV-Partikeln eng mit der HL korreliert ist [1]. Auch klinische Beobachtungen deuten darauf hin, daß EBV in der Pathogenese der HL eine Rolle spielt: Während der Behandlung mit hohen Dosen von Acyclovir (4 × 800 mg pro Tag) über 14 Tage kam es klinisch zur Regression der Veränderungen am Zungenrand [5]. Das offensichtlich eng assoziierte Auftreten des EBV bei der HL hat möglicherweise einen Einfluß auf die weitere Entwicklung der ursächlichen HIV-Infektion. Es ist bekannt, daß EBV in der Lage ist, B-Lymphozyten zu transformieren, so daß diese durch HIV infiziert werden können [15]. Die Einbeziehung solcher transformierter B-Zellen in den Pool der anderen, für HIV empfänglichen

Zellen wie CD4⁺-T-Helfer-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Langerhans-Zellen könnte schließlich zunehmend zu einer deutlichen Vermehrung infizierter, das HIV replizierender Zellen führen. Damit könnte es durch die direkte zytopathische Wirkung des HIV, aber auch durch weitere, indirekte HIV-induzierte, immunpathogenetische Mechanismen zu einem kontinuierlichen Verlust von CD4-positiven Lymphozyten kommen [6, 11].

Danksagung

Für die ausgezeichnete technische Hilfe danken wir Herrn *H. Reupke*. Für die Durchführung der photographischen Arbeiten bedanken wir uns bei Frau *B. Jungnickel*, für die geduldige Manuskripterstellung bei Frau *E. Vornheder*.

Summary

Three biopsies of alterations clinically appearing as hairy leukoplakias (HL) and presenting with the complete picture of AIDS in homosexual men were examined histologically and electron microscopically. Light microscopy revealed the typical features of HL in the form of keratin processes over a thickened horny layer, enlargement of the prickle-cell layer, and the presence of distended, balloon-shaped keratinocytes. Under the electron microscope particles of the herpes virus group could be demonstrated, particularly in the superior third of the epithelium. In addition, the ballooned epithelial cells exhibited special tubulo-reticular structures and characteristic membrane configurations. The ultrastructural findings and the possible pathomechanisms are discussed.

Literatur

1. *Becker, J., Ulrich, P., Kunze, R., Gelderblom, H., Kuntz, A., Schuppan, D., Reichart, P.*: Immunohistochemical detection of HIV structural proteins and distribution of T-lymphocytes and Langerhans cells in the oral mucosa of HIV infected patients. *Virchows Arch* 412, 413 (1988).
2. *Belton, D. M., Eversole, L. R.*: Oral hairy leukoplakia: Ultrastructural features. *J Oral Pathol* 15, 493 (1986).
3. *Daniels, T. E., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Lennette, E., Schiødt, M., Petersen, V., de Souza, Y.*: Absence of Langerhans cells in oral hairy leuko-

- plakia, an AIDS-associated lesion. *J Invest Dermatol* 89, 178 (1987).
4. Eversole, L. R., Jacobsen, P., Stone, C. E., Freckleton, V.: Oral condyloma planus (hairy leukoplakia) among homosexual males: a clinicopathologic study of 36 cases. *Oral Surg* 61, 249 (1986).
 5. Friedman-Kien, A. E.: Viral origin of hairy leukoplakia. *Lancet* Sept 20, 694 (1986).
 6. Gelderblom, H., Reupke, H., Pauli, G.: Loss of envelope antigens of HTLV/LAV, a factor in AIDS pathogenesis? *Lancet* II, 1016 (1985).
 7. Greenspan, D., Greenspan, J. S., Conant, M., Peterson, V., Silverman, S. J., de Souza, Y.: Oral »hairy« leukoplakia in male homosexuals: Evidence of association with both papillomavirus and a herpes group virus. *Lancet* II, 831 (1984).
 8. Greenspan, D., Hollander, H., Friedman-Kien, A., Freese, U. K., Greenspan, J. S.: Oral hairy leukoplakia in two women, a haemophiliac, and a transfusion recipient. *Lancet* II, 978 (1986).
 9. Greenspan, D., Greenspan, J. S., Hearst, N. G., Pan, L. Z., Conant, M. A., Abrams, D. I., Hollander, H., Levy, J. A.: Relation of oral hairy leukoplakia to infection with the Human Immunodeficiency virus and the risk of developing AIDS. *J Infect Dis* 155, 475 (1978).
 10. Greenspan, J. S., Greenspan, D., Lennette, E. T., Abrams, D. I., Conant, M. A., Peterson, V., Freese, U. K.: Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral »hairy« leukoplakia, an AIDS associated lesion. *N Engl J Med* 313, 1564 (1985).
 11. Klatzmann, D., Gluckmann, J. C.: HIV infection: facts and hypotheses. *Immunol Today* 7, 291 (1986).
 12. Konrad, K.: Oral »hairy« leukoplakia – Clinical early manifestation of HTLV-III infection. *Wien Wschr* 98, 702 (1986).
 13. Kuntz, A., Gelderblom, H., Winkel, T., Reichart, P. A.: Ultrastructural findings in oral Kaposi sarcoma (AIDS) *J Oral Pathol* 16, 372 (1987).
 14. Löning, T., Henke, P., Reichart, P., Becker, J.: In situ hybridization to detect Epstein-Barr virus DNA in oral tissues of HIV-infected patients. *Virchows Arch* 412, 127 (1987).
 15. Montagnier, L., Cherman, J. C., Barre-Sinoussi, F., Chamaret, S., Gruest, J., Nugeyre, M. T., Rey, F., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Saimot, G.-A., Rozenbaum, W., Gluckmann, J. C., Klatzmann, D., Vilmer, E., Griscelli, C., Foyer-Gazengel, C., Brunet, J. B.: A new human T-lymphotropic retrovirus: Characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. In: R. C. Gallo, M. E. Essex, L. Gross (eds.): Cold Spring Harbor Laboratory 363 (1984).
 16. Onerheim, R. M., Wang, N., Gilmore, N., Jothy, S.: Ultrastructural markers of lymph nodes in patients with acquired immune deficiency syndrome and in homosexual males with unexplained persistent lymphadenopathy. *Am J Clin Pathol* 82, 280 (1984).
 17. Reichart, P., Gelderblom, H., Becker, J., Kuntz, A.: AIDS and the oral cavity. The HIV-infection: virology, etiology, origin, immunology, precautions and clinical observations in 110 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 16, 243 (1987).
 18. Reichart, P., Gelderblom, H., Pohle, H.-D., Philippsen, H.-P.: »Hairy leukoplakia« (AIDS) – Klinik und Morphologie. *Dtsch Z Mund Kiefer GesichtsChir* 10, 161 (1986).
 19. Rindum, J. L., Schiødt, M., Pindborg, J. J., Scheibel, E.: Oral hairy leukoplakia in three hemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Oral Surg* 63, 437 (1987).
 20. Silverman, S. Jr., Migliorati, C. A., Lozada-Nur, F., Greenspan, D., Conant, M. A.: Oral findings in people with or at high risk for AIDS: a study of 357 homosexual males. *J Am Dent Assoc* 112, 187 (1986).
 21. Zhang, X., Langford, A., Becker, J., Reichart, P., Gelderblom, H.: Ultrastructural findings in oral hairy leukoplakia. *Virchows Arch* 412, 413 (1988).
- Manuskripteingang: 16. 2. 88*
Anschrift der Verfasser:
Dr. X. Zhang
Dr. A. Langford
Prof. Dr. P. Reichart
Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie/
Oralchirurgie
Föhrer Str. 15, D-1000 Berlin 65.
Dr. H. Gelderblom
Abteilung für Virologie
Robert-Koch-Institut
Bundesgesundheitsamt
Nordufer 20, D-1000 Berlin 65. (1156)