

PEMERIKSAAN PENUNJANG LIKEN AMILOIDOSIS

Sukma Anjayani¹, Andi Salsa Anggeraini², Nelly³, Nur Faidah⁴

- 1) Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin RSU Anutapura Palu
cukeyponk@gmail.com
- 2) Departemen Mikrobiologi FKIK Universitas Muhammadiyah Makassar
salsa@med.unismuh.ac.id
- 3) Departemen Patologi Klinik FKIK Universitas Muhammadiyah Makassar
nellymashuri@med.unismuh.ac.id
- 4) Departemen Biokimia FKIK Universitas Muhammadiyah Makassar
nurfaidah@med.unismuh.ac.id

Abstract

Lichen amyloidosis (LA) is a disease caused by amyloid deposits in the dermis which is chronic, localized, and very itchy. LA is characterized by the presence of discretely scattered hyperpigmented and hyperkeratotic papules, which can coalesce to form verrucous plaques, present in the extensor area of the arms and legs. The pathogenesis of LA is unclear but suspected that there is reactivity between antikeratin antibodies and amyloid deposits in the skin. Several examinations can be used to diagnose LA, such as histopathology (hematoxylin-eosin staining and congo-red) and immunofluorescence (IgM, C3, IgA deposits in the basement membrane area). This paper will discuss further about several examinations that can be used to diagnose LA.

Keywords : *Lichen Amyloidosis, Examination, Histopathology.*

Abstrak

Liken amiloidosis (LA) merupakan penyakit akibat deposit amiloid di dermis yang bersifat kronik, terlokalisata, dan sangat gatal. LA ditandai dengan adanya papul hiperpigmentasi dan hiperkeratotik yang tersebar diskret, bisa bersatu membentuk plak verukosa, terdapat di area ekstensor lengan dan tungkai. Patogenesis pasti LA belum diketahui, diduga adanya reaktivitas antara antibodi antikeratin dan deposit amiloid di kulit. Beberapa pemeriksaan penunjang yang bisa dilakukan untuk membantu diagnosis LA, seperti histopatologi (dengan pewarnaan hematoksilin-eosin dan congo-red) dan imunofluoresen (deposit IgM, C3, IgA pada daerah membran basal). Makalah ini akan membahas lebih lanjut mengenai pemeriksaan penunjang yang bisa digunakan dalam membantu menegakkan diagnosis LA.

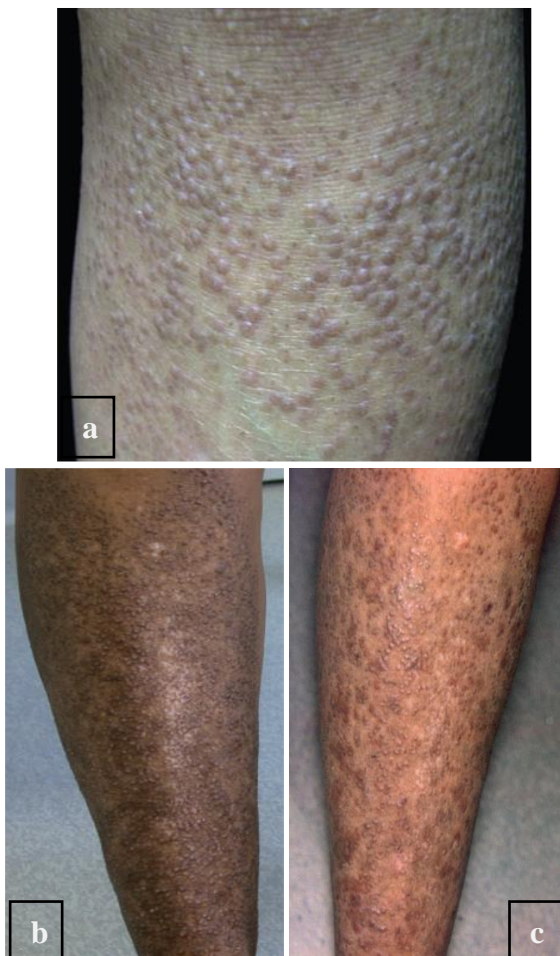
Kata kunci : Liken Amiloidosis, Pemeriksaan Penunjang, Histopatologi.

PENDAHULUAN

Liken Amiloidosis (LA) merupakan penyakit yang bersifat kronik, terlokalisata, dan sangat gatal yang biasanya muncul pada ras tertentu, sering ditemukan di Amerika selatan, tengah dan Asia.¹ LA ditandai dengan adanya papul hiperpigmentasi dan hiperkeratotik yang tersebar diskret dan sangat gatal, bisa bersatu membentuk plak verukosa.^{1,2,3} Tidak terdapat keterlibatan organ viseral, dimana lesi biasanya melibatkan bagian ekstensor lengan dan tungkai.¹

Beberapa pendapat mengemukakan bahwa deposit amiloid pada LA dan makular amiloidosis (MA) merupakan hasil dari frekuensi garukan yang sering karna gatal yang dirasakan. Pada LA didapatkan kerusakan fokal epidermis dan degenerasi filamentosa keratinosit yang diikuti dengan apoptosis dan konversi massa filamentosa (badan koloid) ke dalam materi amiloid pada papularis dermis, dan mungkin diduga adanya kontribusi taut dermo-epidermal.¹ Amiloidosis merupakan terdapatnya deposit jaringan ekstraseluler abnormal dari salah satu substansi yang secara biokimia

berhubungan dengan protein yang memiliki karakteristik dengan pewarnaan tertentu.¹ Patogenesis pasti LA belum diketahui, beberapa studi imunohistokimia menunjukkan adanya reaktivitas antara antibodi antikeratin dan deposit amiloid di kulit pada LA. Deposit amiloid mengandung ikatan disulfida, yang terdapat pada keratin. Deposit amiloid kulit berasal dari degenerasi peptida keratin karena apoptosis keratinosit diubah menjadi fibril amiloid oleh makrofag dermal dan fibroblast.⁴ Pada kulit normal, degenerasi sel yang terjadi akan masuk ke papillaris dermis dan kemudian difagosit makrofag, tapi pada LA dan MA mekanisme ini terjadi lambat dan kurang akibat faktor yang tidak diketahui sehingga terjadi deposit masif keratin yang kemudian menyebabkan terbentuknya deposit amiloid. Sitokeratin-5 (CK-5) diduga terlibat sebagai perekursor pada pembentukan amiloid dan penanda CK5 ini dapat digunakan untuk diagnosis LA dan MA.⁵



Gambar 1a,b,c. Tampak papul hiperkeratotik, hiperpigmentasi pada ekstremitas inferior bagian distal.³

Beberapa modalitas terapi untuk LA, tapi belum ada yang efektif karena angka kekambuhan yang masih tinggi, efek samping dan kegagalan terapi, sehingga dibutuhkan terapi baru dan inovatif.² Beberapa pilihan terapi, seperti kortikosteroid topikal dan intralesi, dermabrasi, mengerok dengan skalpel, etretinat, kalsipotrien, dimetilsulfoksid topikal, terapi ultraviolet-B, dan siklofosfamid.²

Beberapa pemeriksaan penunjang yang bisa dilakukan untuk membantu diagnosis LA, seperti histopatologi (bisa dilihat dengan berbagai pewarnaan seperti hematoksilin-eosin dan *congo-red*) dan imunofluoresen (deposit IgM, C3, IgA pada daerah membran basal).^{6,7,8,9,10} Berikut akan dibahas lebih lanjut mengenai pemeriksaan penunjang yang bisa digunakan untuk membantu dalam menegakkan diagnosis LA.

PEMERIKSAAN PENUNJANG

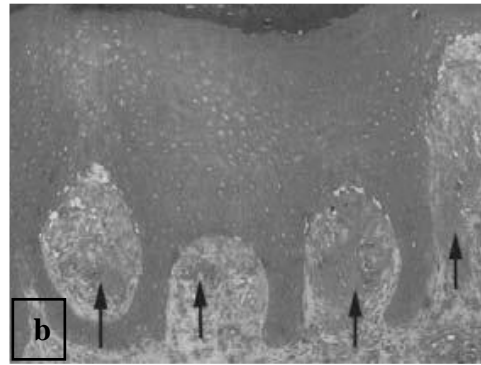
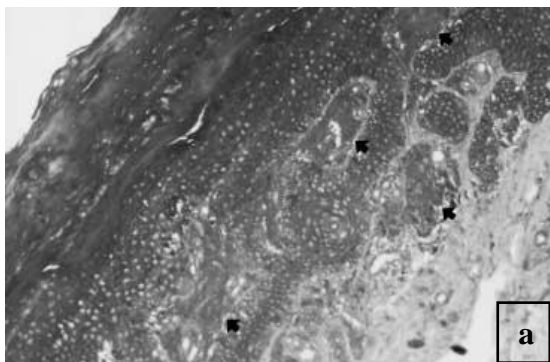
A. Histopatologi

Beberapa pewarnaan dapat digunakan untuk melihat adanya deposit amiloid di kulit. Yang terbaik selama ini digunakan adalah dengan pewarnaan *Congo-red*, dimana dengan sinar polarisasi akan memberikan warna bias seperti warna apel kehijauan. Pewarnaan lainnya, seperti *periodic acid-schiff* (PAS), metal violet, Kristal violet, dan berbagai kapas pewarna (*pagoda red* dan *Sirius red*) dan pewarna fluoresen, tioflavin-T dan *phorwhite BBU*.⁶⁻¹¹

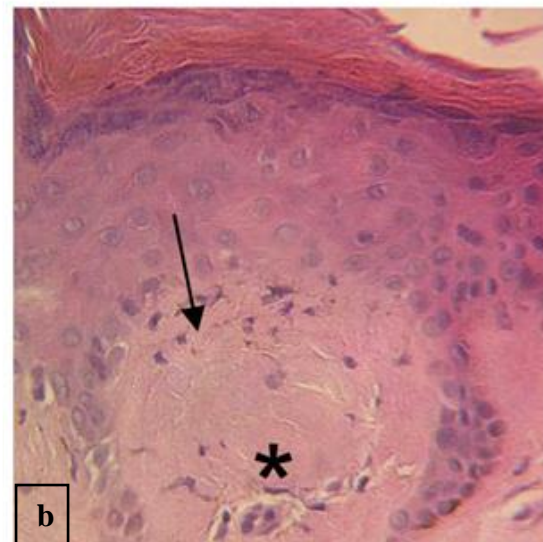
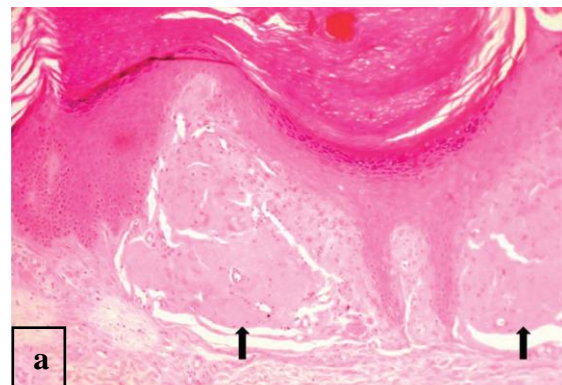
Gambaran histopatologi papul yang biasa didapat yaitu terdapat peningkatan kolagenisasi jaringan fibrosa pada papilaris dermis pada area deposit amiloid.⁹ Pada

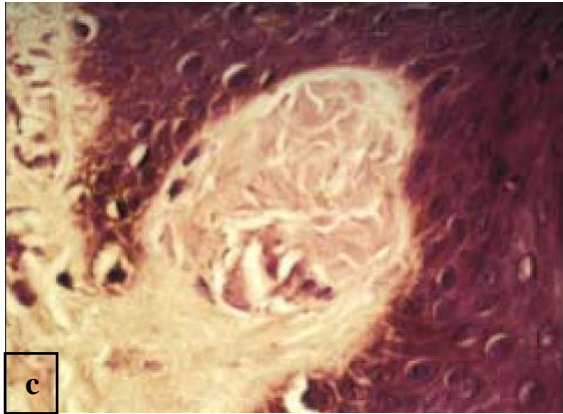
suatu studi (Uguz dkk), melaporkan dengan pewarnaan PAS pada 14 kasus LA dan 4 kasus MA terdapat degenerasi vakuolar dan gangguan kontinuitas ringan hingga sedang pada lapisan basal, dan ketika dibandingkan dengan biopsi pada kulit normal didapatkan adanya peningkatan melanofag yang ditunjukkan dengan pewarnaan Masson-Fontana. Jumlah sel mast dan penyebaran melanofag pada kulit dapat dievaluasi dengan pewarnaan Toluidin blue dan Masson-Fontana.⁸ Deposit amiloid pada LA ditemukan pada papillaris dermis, yang biasanya terdapat di bagian atas papillaris dermis. LA dibedakan dari amiloidosis makular dengan adanya perubahan di bagian epidermal, seperti hiperkeratosis dan akantosis.^{6,12,13,14,15}

Salim dkk, melaporkan dari 30 hasil biopsi pada pasien LA setelah pewarnaan HE dan *congo red*. Pada lapisan epidermal ditemukan hiperkeratosis pada 30 pasien (100%), akantosis pada 27 pasien (90%), papillomatosis pada 10 pasien (33,3%), hipergranulosis pada lima pasien (16,7%) dan elongasi *rete ridge* pada empat pasien (13,3%). Deposit amiloid didapatkan pada 28 pasien yang pada gambaran histopatologi memberikan gambaran globul berwarna pink pada papillaris dermis. Pada tiga pasien (30%), deposit amiloid didapatkan sebagai deposit perifolikular. Infiltrat limfosit pada bagian atas dermis didapatkan pada 21 pasien (70%). Deposit amiloid yang nampak pada pewarnaan *congo red* didapatkan pada seluruh biopsi pasien (100%).¹⁰

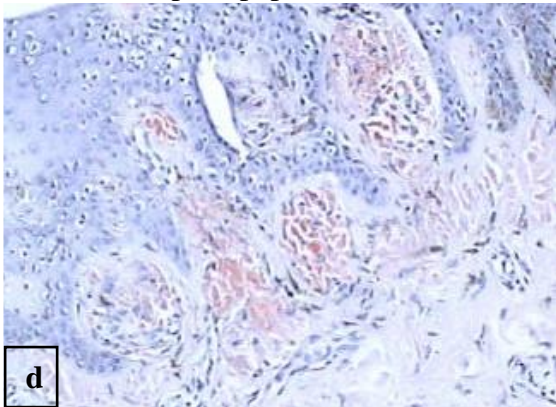


Gambar 2a,b. Tampak deposit substansi amorf pada papillaris dermis. Pada epidermis tampak akantosis dan hiperkeratosis ringan. Deposit amorf tampak positif dengan pewarnaan Kristal violet^{4,12,13}.

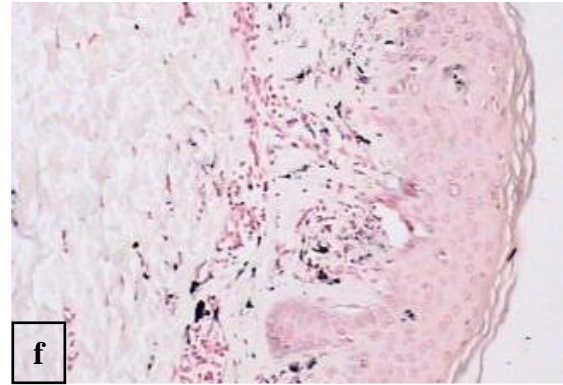




Gambar 3a,b,c. Pada pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) tampak hiperkeratosis dan rete ridge yang ireguler dengan deposit amiloid yang berwarna merah muda pada papillaris dermis.^{7,10}



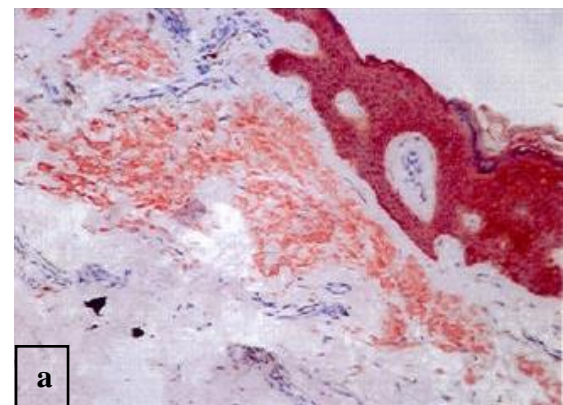
Gambar d,e. Tampak deposit amiloid di dermis yang ditunjukkan dengan warna orange-merah pada pewarnaan Congo-red^{8,9}

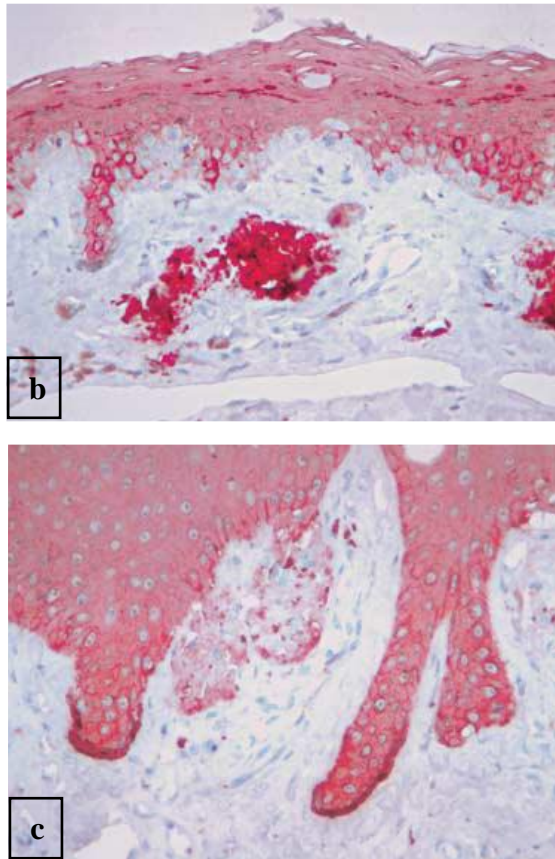


Gambar f. Tampak peningkatan melanofag pada lesi LA yang ditunjukkan dengan pewarnaan Masson-Fontana.^{8,9}

B. Imunohistokimia

Apaydin, melaporkan antibodi CK5 untuk membantu diagnosis LA dan MA.⁵ Sitokeratin (CK) merupakan salah satu anggota protein filamen yang diekspresikan secara spesifik pada sitoplasma sel epitel. Filamen CK terdiri dari beberapa polipeptida yang berbeda. Protein ini merupakan penanda yang penting pada diferensiasi sel normal dan abnormal. Imunoreaktivitas CK 5 didapatkan pada keratinosit epidermis pada deposit amiloid dari biopsi LA dan intensitasnya dimulai dari sedang hingga banyak sekali.^{5,16,17} CK5 diekspresikan keratinosit pada lapisan basal dan spinosum di atas dari deposit amiloid.^{5,16,17}





Gambar 4a. Tampak adanya deposit keratin pada papillaris dermis pada studi imunohistokimia dengan anti-pankeratin; **b.** Immunoreaktivitas dengan sitokeratin berat molekul tinggi pada deposit amiloid; **c.** Ekspresi CK5 pada deposit amiloid^{5,8}

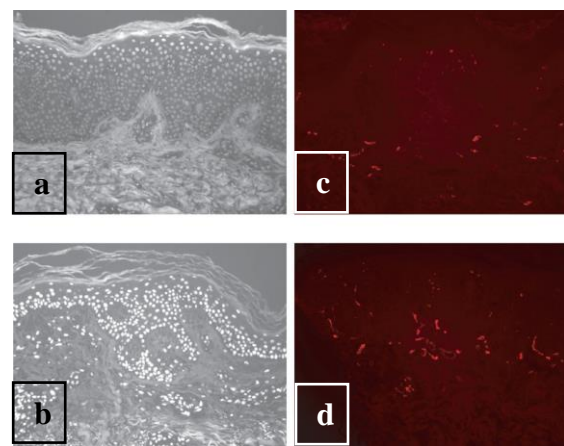
C. Direct Immunofluorescence (DIF)

Salim dkk, melaporkan pada pemeriksaan menggunakan DIF, biopsi dari 30 pasien LA menunjukkan fluoresen dengan IgM, C3, IgA pada sepanjang daerah membran basal, dengan intensitas fluoresen paling kuat pada IgM dari semua kasus.¹⁰

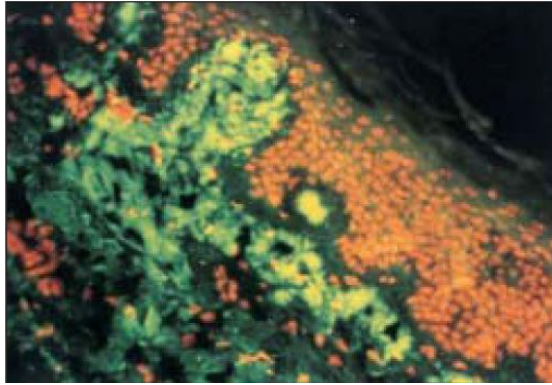
Terdapatnya komponen amiloid P pada deposit dermal di amiloidosis kutaneus yang ditunjukkan dengan teknik *Direct immunofluorescence* (DIF) menggunakan antibodi serum komponen amiloid P. Amiloid P diperlihatkan merupakan konstituen kulit normal manusia, yang terdapat pada bagian perifer serat elastis dermis, pada bagian membran basal pembuluh darah dermal dan disekeliling kelenjar keringat ekrin tapi tidak ditemukan pada membran basal dermo-epidermal.

Gambaran pewarnaan pada amiloidosis kutaneus secara morfologi memiliki gambaran khusus dan dibedakan dari pewarnaan pada penebalan membran basal vaskular pada porfiria. Imunofluoresen dengan menggunakan anti serum amiloid P merupakan pemeriksaan yang sederhana dan spesifik untuk bisa membedakan diagnosa banding LA.^{6,17,18,19,20,21}

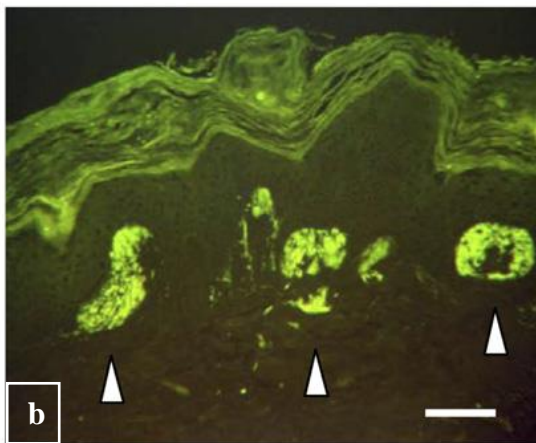
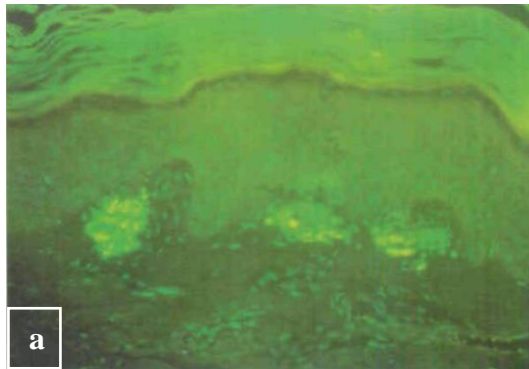
Maddison dkk, melaporkan terdapat penurunan jumlah serabut saraf di epidermis dan taut dermo-epidermal pada lesi LA. Pada studi tersebut biopsi kulit yang telah mengandung formalin-parafin diproses untuk dilakukan pewarnaan tidak langsung imunofluoresen. Serabut saraf dilabel dengan antibodi poliklonal kelinci yang merupakan marker panneuronal produk gen protein (PGP) 9,5 (1:2000; Ultracclone, Yarmouth, Inggris), konjugasi biotin antibodi sekunder anti-kelinci (1:400; Amersham Biosciences, Amersham, Inggris) dan antibodi tersier AlexaFluor 594-terkonjugasi streptavidin (1: 400; Probe Molekuler, Leiden, Belanda).¹



Gambar 5a,b,c,d Tampak pada LA didapatkan kehilangan serabut saraf yang signifikan pada epidermis dan taut dermo-epidermal. Serabut saraf secara morfologi tampak lebih tipis dan cabang yang kurang. Pada orang normal didapatkan jumlah serabut saraf yang normal. Cabang serabut saraf dan terminal pada berbagai lapisan epidermis.¹



Gambar 6. Pada pemeriksaan menggunakan DIF tampak deposit amiloid lobular yang berwarna hijau pada papillaris dermis



Gambar 7a,b Pada pemeriksaan menggunakan DIF tampak deposit amiloid lobular yang berwarna hijau pada papillaris dermis; b,c. Deposit amiloid di papillaris dermis, tampak fluoresen kehijauan dengan pewarnaan Thioflavin.^{10,11}

D. SEKUENSING GENETIK

Pada Amiloidosis kutaneus lokalisata primer familial (AKLPF) merupakan kelainan autosomal dominan, dimana pada studi analisis gen didapatkan mutasi pada gen *Oncostatin M receptor* (OSMR) yang mengkode *Oncostatin M-specific receptor β* (OSMR β). OSMR β merupakan komponen reseptor tipe II OSM dan Interleukin (II-31) dan pada kultur keratinosit AKLPF menunjukkan kurangnya aktivasi jalur Jak/STAT, MAPK dan PI3/Akt setelah stimulasi OSM atau sitokin IL-31.^{13,14,15}

Arita dkk, pada studinya melakukan analisis kandidat gen yang terlibat pada AKLPF keluarga Brazilian dengan sekuensing DNA. Ia mendapatkan adanya mutasi pada gen OSMR yang mengkode OSMR β , begitu juga pada AKLPF pada keluarga dari Amerika dan Afrika Selatan. Metode yang ia gunakan dengan sampel DNA, analisis mikrosatelit dan sekuensing. Genom DNA yang diekstraksi dari darah perifer pada tiga keluarga dari negara yang berbeda. DNA diamplifikasi dengan lima set primer untuk marker mikrosatelit yang berlokasi antara 5p13.2 dan 5q11.2. Produk PCR lalu dianalisis pada sekuenser ABI 310 DNA dengan software genescan 2.1 dan genotiper 2.0. Skor *two-point LOD* dihitung dengan algoritma MLINK dari LINKAGE versi 5.1 dengan asumsi frekuensi alel mutan 0,00001 dan 100%. Analisis gen kandidat selanjutnya dilakukan. Untuk sekuensing, sampel DNA diamplifikasi dengan primer yang terletak dalam intron yang mengapit ekson dari gen OSMR.. Produk PCR disekuensing dengan reagen terminator *ABIBigDye* pada sekuenser ABI 310.^{13,14,15}

Pada RT-PCR, mRNA diekstraksi dari specimen biopsi kulit dengan menggunakan alat QIAGEN beserta sintesis cDNA selanjutnya dengan *Superscript II reverse transkriptase* (invitrogen). Primer-primer yang memiliki target di dekat ujung-3' dari cDNA digunakan untuk mengamplifikasi

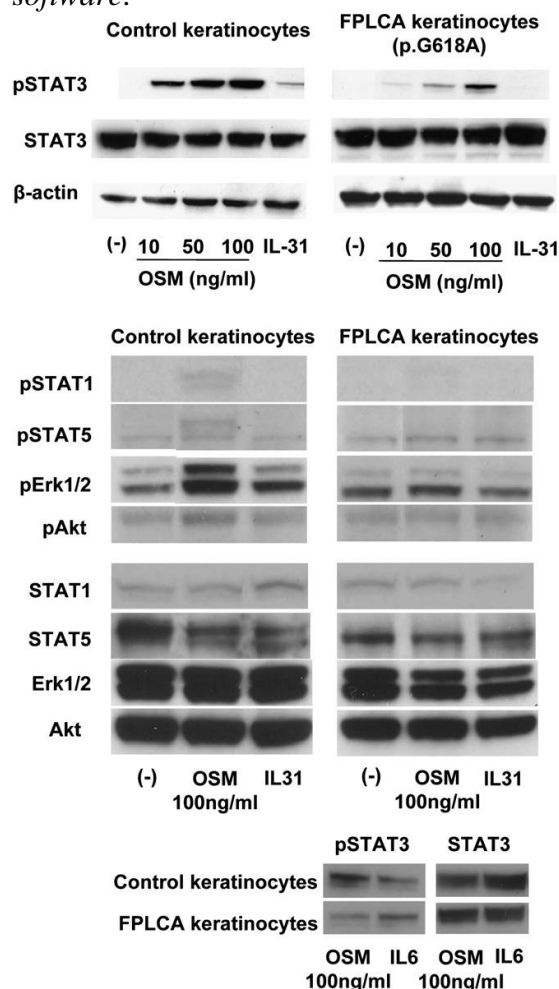
reseptor sitokin IL-6 dan ligan-ligan yang bersangkutan.^{13,14,15}

E. PENGISOLASIAN KULTUR DAN KERATINOSIT

Kultur-kultur keratinosit primer diisolasi menurut prosedur standar. Secara singkat, fragmen-fragmen biopsi kulit dicelupkan dalam larutan tripsin-EDTA selama 1 jam pada suhu 37°C. Larutan ini selanjutnya disaring melalui strainer sel pori 100 µm (VWR), dan kemudian medium yang telah ditambahkan 10% serum janin sapi (FBS) ditambahkan untuk menetralkan tripsin. Sel-sel diisolasi dengan sentrifus (5 menit, 1000 rpm), dan bulatan yang terbentuk disuspensi ulang dalam medium keratinosit normal. Terakhir, sel-sel dibiakkan dalam gelas kimia T25 yang mengandung makanan. Keratinosit-keratinosit dipertahankan pada medium DMEM:Ham F21 yang telah ditambahkan FBS 10%, 5 µg/mL transferin, 0,4 µg/mL hidrokortison, 10⁻¹⁰ toksin kolera, 10 ng/mL faktor pertumbuhan epidermal (EGF) 1,5 µg/mL insulin, dan 2 x 10⁻¹¹ M liothironin. Sel-sel *feeder* NIH 3T3 yang diperlakukan dengan mitomisin C segar ditambahkan ke keratinosit primer dua kali sepekan. Keratinosit yang keluar lebih awal dinonaktifkan dengan HPV16 (E6^ΔE7).^{13,15} Keratinosit dibiakkan dalam plat 6-wadah dan ditumbuhkan sampai bergabung. Sel-sel dipertahankan dalam medium keratinosit normal selama 3-5 hari setelah penggabungan. Sebelum stimulasi sitokin, sel-sel dicuci dua kali dalam larutan salin bufer fosfat (PBS) dan diinkubasi dalam medium bebas serum (invitrogen) selama 2 atau 24 jam. Kultur-kultur kemudian distimulasi dengan sitokin yang relevan selama 15 menit sebelum preparasi hasil lisis untuk imunoblotting. Sitokin-sitokin yang digunakan dalam penelitian ini adalah OSM rekombinan, IL-6 dan IL-31. Konsentrasi sitokin yang digunakan adalah 10, 50, dan 100 ng/mL untuk OSM dan 100 ng/mL untuk IL-6 dan IL-31.^{13,14}

F. IMMUNOBLOTTING

Sel-sel dicuci satu kali dengan PBS dingin dan dilisiskan dengan buffer RIPA yang mengandung anti protease. Hasil lisis sel diperlakukan dengan 4-12% NuPAGE Novex Bis-Tris Gel (Invitrogen). Protein-protein yang terfraksionasi ditransfer ke membran transfer nitroselulosa *Hybond-ECL* (Amersham Bioscience). Membran dihambat dengan 5% susu-TTBS non-lemak selama 2 jam pada suhu ruangan dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C dengan antibodi primer yang relevan. Kompleks antibodi-antigen dilihat dengan emiluminesensi bertingkat (Amersham Bioscience). Kepadatan optik dari berkas pada blot dihitung dengan *Image J software*.^{13,14,15}



Gambar 8. Western Blotting (p)-STAT terfosforilasi, pErk1/2, dan pAkt Keratinosit terkultur yang distimulasi dengan OSM atau IL-31. Fosforilasi STAT, Erk1/2, dan Akt diamati setelah stimulasi

oleh OSM dan IL-31 pada keratinosit manusia normal, tetapi pada keratinosit FPLC terdapat pengurangan fosforilasi STAT, Erk1/2, dan Akt oleh OSM dan tidak ada aktivasi oleh IL-31. Pengurangan pSTAT3 lebih ditunjukkan pada konsentrasi OSM bawah. Stimulasi oleh IL-6 tidak menghasilkan perubahan fosforilasi pada keratinosit FPLCA.¹³

REFERENSI

1. Maddison B, Namazi MR, Samuel LS, et al. Unexpected diminished innervations of epidermis and dermoepidermal junction in lichen amyloidosis. *Br J Dermatol* 2008;159:403-6.
2. Behr FD, Levine N, Bangert J. Lichen amyloidosis associated with atopic dermatitis. *Arch Dermatol* 2008;137:553-5.
3. Choi JYJ, Sippe J, Lee S. Acitretin for lichen amyloidosis. *Australas J Dermatol* 2008;49:109-13.
4. Tursen U, Kaya TI, Dusmez D, Ikizoglu G. Case of generalized lichen amyloidosis. *Int J Dermatol* 2006;42:649-51
5. Apaydin R, Gurbuz Y, Bayramgurler D, Muezzinoglu B, Bilent N. Cytokeratin expression in lichen amyloidosis and macular amyloidosis. *Eur Acad Dermatol Venereol* 2006;18:305-9
6. Breathnach SM, Bhogal B, Dyck RF, De Beer FC, Black MM, Pepys MB. Immunohistochemical demonstration of amyloid P component in skin normal subjects and patients with cutaneous amyloidosis. *Br J Dermatol* 1998;205:115-24
7. Kang MJ, Kim HS, Kim HO, Park YM. A case of atopic dermatitis-associated lichen amyloidosis successfully treated with oral cyclosporine and narrow band UVB therapy in succession. *J Dermatolog Treat* 2009;20:368-70
8. Uguz A, Karaoglan A, Ergin M, Tuncer I, Karakas M. Analysis of mast cells, melanophages and keratin deposition in the primary localized cutaneous amyloidosis. *Aegean Path Soc* 2006;1:71-5
9. Gupta R, Gupta S. Dexamethasone cyclophosphamide pulse therapy in lichen amyloidosis: a case report. *J Dermatolog Treat* 2007;18:249-51
10. Salim T, Shenol SD, Balachandran C, Mehta VR. Lichen amyloidosis: a study of clinical, histopathologic and immunofluorescence findings in 30 cases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005;71:166-9
11. Ramirez-santos A, Labandeira J, Monteagudo B, Toribio J. Lichen amyloidosis without itching indicates that is not secondary to chronic scratching. *Acta Derm Venereol* 2006;86-7
12. Sezer E, Erbil AH, Koseoglu RD, Filiz N, Kurumlu Z. Successful treatment of lichen amyloidosis with cryosurgery. *Gulhane Tip Dergisi* 2006;48:112-4
13. Arita K, South AP, Filho-Hans G, et al. Oncostatin M Receptor- β mutation underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Am J Hum Gen* 2008;82:73-80
14. Tanaka A, Arita K, Lai-cheong JE, Palisson F, Hide M, McGrath JA. New insight into mechanisms of pruritus from molecular studies on familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Br J Dermatol* 2009;161:1217-24
15. Sakuma TH, Hans-Filho G, Arita K, et al. Familial primary localized cutaneous amyloidosis in Brazil. *Arch Dermatol* 2009;145:695-99
16. Eto H, Hashimoto K, Kobayashi H, Fukaya T, Matsumoto M, Sun TT. Differential staining of cytooid bodies and skin limited amyloids with

- monoclonal anti-keratin antibodies.
Am J Pathol 1994;116:473-81
17. AL-Ratrout JT, Satti MB. Primary localized cutaneous amyloidosis: a clinicopathologic study from Saudi Arabia. *Int J Dermatol* 2007;36:428-34
 18. Grimmer J, Weiss T, Weber L, Meixner D, Scharffetter-Kochanek K. Successful treatment of lichen amyloidosis with combined bath PUVA photochemotherapy and oral acitretin. *Clin Exp Dermatol* 2006;32:39-42
 19. Oiso N, Yudate T, Kawara S, Kawada A. Successful treatment of lichen amyloidosis associated with atopic dermatitis using a combination of narrowband ultraviolet B phototherapy, topical corticosteroid and an histamine. *Clin Exp Dermatol* 2009;34:e833-36
 20. Lachmann HJ, Hawkins PN. Amyloidosis and the skin. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: Mc. Graw Hill Medical; 2008.p.1257-65
 21. Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF. Metabolic disease of the skin. In: Elder DE, Johnson Jr B, Elenitsas R, editors. *Lever's Histopathology of the skin*. 9th ed. New York: Lipincott Williams & Wilkins;2005.p.