

© Borgis

Rola receptora aktywatora jądrowego czynnika kappa B (RANKL) oraz osteoprotegeryny (OPG) w rozwoju zębopochodnych torbieli i ziarniniaków okołowierzchołkowych kości szczęki i żuchwy

***Michał Ratajczak, Monika Sakowicz-Burkiewicz, Jerzy Kuczkowski, Grażyna Gulida, Anna Starzyńska, Jadwiga Gawrońska-Skorkowska, Adam Włodarkiewicz, Tadeusz Pawełczyk**

Katedra i Klinika Chirurgii Szczykowo-Twarzowej i Stomatologicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. med. Adam Włodarkiewicz

ROLE OF RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR KAPPA B (RANKL) AND OSTEOPROTEGERIN (OPG) IN THE DEVELOPMENT OF THE ODONTOGENIC CYSTS AND PERIAPICAL GRANULOMAS OF THE JAWS

Summary

Introduction: In the periapical lesions of teeth occurs the bone destruction, induced by osteoclasts, which are controlled by receptor activator of nuclear factor NF- κ B (RANK), its ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). In these changes the ratio RANKL/OPG is disturbed which leads to the pathological bone resorption.

Aim: The aim of this study was to assess the expression of key mediators regulating the formation and differentiation of osteoclasts and osteoblasts in chronic periapical lesions of teeth' roots and to clarify their role in the process of bone degradation.

Material and methods: The research material was obtained from 36 patients (24 men and 12 women) with periapical lesions of teeth, treated in the Dental and Maxillofacial Surgery Clinic of GUMed. The control group for molecular studies constituted healthy tongue mucosa and alveolar mucosa without inflammation. Tissue material for research was captured and then subjected to histopathological, immunohistochemistry and molecular examination.

Results: Immunohistochemistry analysis showed the increased expression of RANKL protein in all examined periapical lesions (periapical granulomas and odontogenic cysts).

Conclusions: Increased expression of RANKL and OPG in periapical granulomas, radicular cysts and follicular cysts demonstrates their role in the process of bone resorption. The obtained results of immunohistochemistry and molecular evidence of the impact of RANKL and OPG on the process of bone resorption in the maxilla and mandible.

Key words: RANKL/RANK/OPG pathway, odontogenic jaw cysts, bone resorption

WSTĘP

Kość jest tkanką, która ulega ciągłej przebudowie. Głównymi procesami metabolicznymi w kości są: proces modelowania polegający na wymianie składników kośćca (tworzenie nowej kości) oraz remodelacja (po 30. roku życia),

czyli wewnętrzna przebudowa kości, po zakończeniu wzrostu i osiągnięciu szczytowej masy kostnej. Podczas modelowania kości wzrasta ona na długość i grubość. Wyrostek zębodołowy szczęki i żuchwy również ulega tej przebudowie (1, 2). Remodelacja warunkuje właściwości regenera-

cyjne kości. Istotą procesów modelowania i remodelowania są następujące po sobie resorpcja i nawarstwianie kości (3). W warunkach fizjologicznych procesy te podlegają ścisłej kontroli, za którą odpowiada szlak RANKL/RANK/OPG. Elementami tego układu są: receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B* – RANK), jego ligand RANKL (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B Ligand* – RANKL) oraz osteoprotegeryna (ang. *Osteoprotegerin* – OPG) (4, 5). RANKL należy do nadrodziny białek czynników martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor* – TNF). Na poziomie ekspresji RANKL wpływ mają cytokiny (IL-1 α , IL-6, IL-11, TNF- α) i glikokortykosteroidy oraz komórki podścieliska, osteoblasty, osteoklasty, komórki mezenchymalne okostnej, chondrocyty i komórki śródbłonka (6). RANKL kontroluje różnicowanie osteoklastów poprzez specyficzny receptor znajdujący się na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów. Jest czynnikiem, który wraz z M-CSF (ang. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*) aktywuje cały proces tworzenia dojrzałych osteoklastów, czyli różnicowanie i przeżywanie komórek resorpcyjnych (hamuje apoptozę osteoklastów). RANKL ponadto stymuluje uwalnianie niedojrzałych prekursorów osteoklastów (7). Receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B jest białkiem przezłonowym. Obecność RANK wykazują komórki linii monocytarno-makrofagowej, limfocyty T i B, proteosteoklasty i osteoblasty, komórki dendrytyczne, fibroblasty, chondrocyty i komórki śródbłonka naczyniowego. Ponadto obecność tego białka stwierdzono w szpiku kostnym, kościach, mózgu, wątrobie, sercu, nerkach, płucach, tkankach sutka, mięśniach szkieletowych i skórze (8-10). Połączenie RANK ze swym ligandem na powierzchni osteoklastów doprowadza do uruchomienia kaskady sygnałów, które aktywują swoiste geny odpowiadające za przeżycie i różnicowanie osteoklastów, a także za resorpcję kości (10). OPG należy do nadrodziny receptorów czynników martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor* – TNFR) (3, 6, 11, 12). Transkrypty mRNA dla OPG stwierdzono w osteoblastach i komórkach podścieliska szpiku kostnego, a także w komórkach limfoidalnych, śródbłonka, limfocytach T i B oraz megakariocytach. OPG jest receptorem kompetycyjnym (ang. *Decoy Receptor*) dla RANKL, stanowi dla niego swoisty receptor-pułapkę (atrapę) (10). Łącząc się z nim, blokuje połączenie z RANK, tym samym zapobiega jego aktywacji na powierzchni osteoklasta i wystąpieniu resorpcji kości (11) poprzez modulację syntezy osteoklastów (10). W warunkach fizjologicznych istnieje ścisła równowaga pomiędzy ilością białka RANKL i OPG. Równowaga ta może zostać zaburzona w wielu chorobach układu kostnego. Wśród chorób kości szczęki i żuchwy często występują zmiany okołowierzchołkowe o charakterze zapalnym rozwijające się na skutek infekcji bakteryjnej kanałów korzeniowych. Przedostawanie się bakterii i ich toksyn poza ząb powoduje napływ, aktywację oraz interakcje pomiędzy komórkami zapalnymi i obronnymi organizmu (13, 14). Prowadzi to do utraty prawidłowej struktury kostnej szczęk. Miejsce po zresorbowanej kości zastępowane jest przez ziarninę, która może organizować się w zmiany o charakterze torbieli korzeniowych. Zmiany te mogą osiągać duże rozmiary, doprowadzając do deformacji i niszczenia otaczającej je kości (15, 16). Poznanie patomechanizmu powstawania

zmian okołowierzchołkowych zębów może być przydatne w rozpoznawaniu i leczeniu tych chorób.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena ekspresji głównych mediatorów regulujących powstawanie i różnicowanie osteoklastów i osteoblastów w przewlekłych zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów oraz wyjaśnienie ich roli w procesie niszczenia kości.

MATERIAŁ I METODY

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (Reg. nr NKEBN/375/2009). Materiał do badań pobrano od 36 pacjentów (24 mężczyzn i 12 kobiet) w wieku od 17 do 89 lat (średnia wieku 45,75 lat) podczas zabiegów wykonywanych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej i Stomatologicznej oraz Poradni Chirurgii Stomatologicznej GU-Med. Uzyskano następujące typy zmian chorobowych: ziarniniaki okołowierzchołkowe (n = 14), torbiele zapalne (n = 17) oraz torbiele zawiązkowe (n = 5). Grupę kontrolną dla badań molekularnych stanowiła zdrowa błona śluzowa języczka i wyrostka żębodołowego bez stwierdzonego stanu zapalnego. Materiał tkankowy utrwalono w 10% roztworze formaliny. Do badania immunohistochemicznego wykorzystywano 4 μ m skrawki materiału tkankowego. Zastosowano następujące przeciwciała: RANKL – Monoclonal Anti-human TRANCE/TNFSF 11 nr kat. MAB626, firma R&D Systems; OPG – Anti-human Osteoprotegerin/TNFRSF11B Antibody nr kat. AF805, firma R&D Systems. Związane przeciwciała oznaczano z użyciem systemu DAKO (LSAB + system HRP).

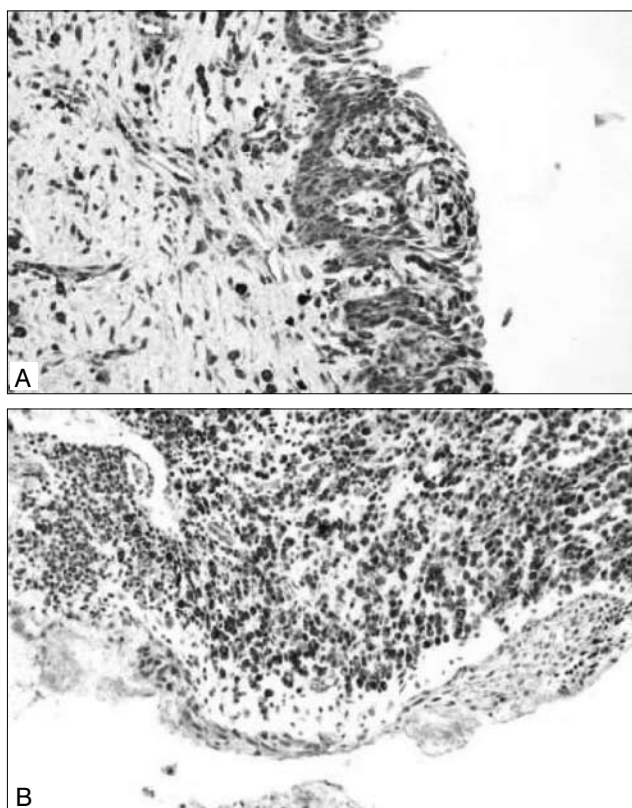
WYNIKI

Na podstawie badań radiologicznych i makroskopowych wykazano, że 39% zmian osiągnęło rozmiary od 0,3 do 0,8 cm, 58% od 0,9 do 3 cm, 3% zmian przekroczyło wielkość 3 cm. Materiał tkankowy został poddany badaniu histologicznemu. Rozpoznano: torbiele korzeniowe u 17 (47%), ziarniniaki okołowierzchołkowe u 14 (38%) i torbiele zawiązkowe u 5 (14%) chorych. Zmiany okołowierzchołkowe występowały głównie w grupie mężczyzn w wieku od 30. do 59. roku życia. Najczęstszą lokalizacją ziarniniaka była żuchwa (57%), torbieli korzeniowej – szczęka (65%), torbieli zawiązkowej – żuchwa w okolicy zębów ósmych (80%).

Poziom ekspresji RANKL i OPG oceniano w odniesieniu do ilości immunoreaktywnych komórek w zmianie chorobowej (ryc. 1A, 1B).

Obecność RANKL wykazano niemal we wszystkich subpopulacjach komórek w każdej badanej zmianie okołowierzchołkowej (w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych). Najwięcej komórek z wysokim poziomem ekspresji liganda receptora RANK odnotowano w zmianach okołowierzchołkowych o średnicy 0,9-3 cm oraz 0,3-0,8 cm. Wyniki badań immunohistochemicznych przedstawiają tabele 1 i 2.

Porównując poziom ekspresji OPG z wielkością zmiany, wykazano, że ekspresja na średnim poziomie była w zmianach okołowierzchołkowych o średnicy



Ryc. 1. Analiza immunohistochemiczna: A – ekspresja RANKL w komórkach wyściółki nabłonkowej i elementach nacieku zapalnego torbieli zębopochodnej (RANKL x 100); B – ekspresja OPG w komórkach wyściółki nabłonkowej i elementach nacieku zapalnego torbieli zębopochodnej (OPG x 100).

0,9-3 cm. Niską ekspresję stwierdzano głównie w ziarniniakach o średnicy 0,3-0,8 cm.

Porównanie poziomu ekspresji białek RANKL, OPG w trzech rodzajach zmian okołowierzchołkowych nie wykazała istotnych statystycznie różnic. Stosunek RANKL/OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i zawiązkowych był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej.

Analiza statystyczna wzajemnych zależności badanych białek wykazała silną korelację pomiędzy RANKL i OPG w zmianach chorobowych. RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w zmianach okołowierzchołkowych.

DYSKUSJA

Analiza immunohistochemiczna ziarniniaków okołowierzchołkowych, torbieli zapalnych i zawiązkowych wykazała wyższy poziom ekspresji RANKL niż OPG. Wysoki i średni poziom ekspresji liganda RANKL występuje przede wszystkim w większych torbielach zapalnych o średnicy 0,9-3 cm. Ekspresja RANKL w ziarniniakach okołowierzchołkowych była głównie na średnim poziomie. Porównując ekspresję RANKL-pozytywnych komórek w ziarniniakach i torbielach korzeniowych, wykazano silniejszą ich ekspresję w torbielach. Może to mieć związek z ekspansywnym wzrostem torbieli zębopochodnych i znacznie silniejszą tendencją do wzrostu i niszczenia otaczającej kości niż w ziarniniakach.

Tabela 1. Wyniki badań immunohistochemicznych. Ekspresja RANKL w zmianach zębopochodnych (ziarniniaki okołowierzchołkowe, torbiele korzeniowe oraz torbiel zawiązkowa) kości szczęk.

Charakter zmiany	Poziom ekspresji RANKL				Razem
	Brak (0)	Niski (+)	Średni (++)	Wysoki (+++)	
Ziarniniak okołowierzchołkowy	0	0	6 (17%)	8 (22%)	14 (39%)
Torbiel korzeniowa	0	0	6 (17%)	11 (30%)	17 (47%)
Torbiel zawiązkowa	0	0	1 (3%)	4 (11%)	5 (14%)
Razem	0	0	13 (37%)	23 (63%)	36 (100%)

Tabela 2. Wyniki badań immunohistochemicznych. Ekspresja OPG w zmianach zębopochodnych (ziarniniaki okołowierzchołkowe, torbiele korzeniowe oraz torbiel zawiązkowa) kości szczęk.

Charakter zmiany	Poziom ekspresji OPG				Razem
	Brak (0)	Niski (+)	Średni (++)	Wysoki (+++)	
Ziarniniak okołowierzchołkowy	0	5 (14%)	9 (25%)	0	14 (39%)
Torbiel korzeniowa	0	4 (11%)	13 (36%)	0	17 (47%)
Torbiel zawiązkowa	0	0	5 (14%)	0	5 (14%)
Razem	0	9 (25%)	27 (75%)	0	36 (100%)

Poziom osteoprotegeryny w badanych zmianach okołowierzchołkowych był znacząco niższy aniżeli RANKL. Komórki OPG pozytywne występowały przede wszystkim w torbielach korzeniowych o średnicy 0,9-3 cm. Poziom ekspresji OPG był na poziomie średnim (n = 13) i niskim (n = 4). Biorąc pod uwagę wzmożoną ekspresję RANKL w zmianach o charakterze torbieli zapalnej, prowadzącą do resorpcji okolicznych struktur kostnych, występowanie od 5-50% OPG-pozytywnych komórek w badanym materiale tkankowym może świadczyć o próbie obrony organizmu przed nadmierną, patologiczną utratą kości w trakcie trwającego procesu zapalnego. Znaczna przewaga ekspresji RANKL nad OPG prowadzi do aktywacji osteoklastów i resorpcji kości.

Analizując ilość wybarwionych komórek RANKL i OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych, można sądzić, że pomimo pewnych różnic w ilości pozytywnie wybarwionych komórek, charakter zmiany nie ma znaczącego wpływu na stosunek RANKL/OPG. Do zbliżonych wniosków doszli Menezes i wsp. (15). Autorzy ci badali immunohistochemicznie ziarniniaki okołowierzchołkowe

i torbiele zapalne, które wykazywały większą ilość komórek RANKL+ niż komórek OPG+ w tych zmianach. Ponadto z ich obserwacji wynika, że ilość pozytywnie wybarwionych komórek RANKL i OPG była większa w ziarniniakach niż w torbielach korzeniowych, inaczej niż w naszych badaniach. Stosunek RANKL/OPG nie wykazywał statystycznie znamiennych różnic zarówno w naszych badaniach, jak i cytowanych autorów (15).

Chociaż w warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy RANKL a OPG, to ilość utraconej kości jest zbliżona do ilości kości odbudowanej. W stanach zapalnych kości dochodzi do zwiększenia ekspresji RANKL. Gdy rośnie stosunek RANKL/OPG, dochodzi do zwiększenia procesu resorpcji (8). Decyzja o włączeniu do badań torbieli zawiązkowych była podyktowana tym, iż pomimo braku etiologii zapalnej, jest to druga najczęściej rozpoznawana torbiel zębopochodna kości szczęk, doprowadzająca do znacznego niszczenia otaczającej struktury kostnej.

W naszych badaniach wykazano wyższą ekspresję RANKL w zmianach zapalnych wyrostka zębodołowego niż w grupie kontrolnej. Ekspresja OPG w badanych tkankach była również wyższa niż w grupie kontrolnej, ale nie był to wzrost znamienny statystycznie. Jak wynika z badań innych autorów, wzrost ekspresji mRNA OPG w tkankach zapalnych (badany metodą RT-PCR) nie jest równoważny ze wzrostem poziomu tego białka w komórce (badanie immunohistochemiczne) (15, 17).

Z naszych badań wynika, że porównanie poziomu białek RANKL i OPG oraz stosunku RANKL/OPG w trzech rodzajach zmian chorobowych nie wykazało znamiennych statystycznie różnic. W torbieli korzeniowej stwierdzono niewielki wzrost ekspresji białka RANKL i obniżenie OPG w odniesieniu do ziarniniaka. Ekspresja RANKL i OPG w torbieli zawiązkowej była na niskim poziomie. Nie były to różnice znamienne statystycznie. Należy jednak pamiętać, że obserwacje te dotyczą małej grupy chorych i wymagają one dalszych badań. Ekspresja RANKL, OPG i stosunek RANKL/OPG pomiędzy poszczególnymi typami zmian chorobowych a grupą kontrolną były znacząco wyższe w grupie badanej. Uzyskane przez nas wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów (15, 17-19). Analiza statystyczna wykazała silną korelację pomiędzy RANKL a OPG w zmianach okołowierzchołkowych. W stanach patologicznych, ekspresja RANKL i OPG jest dodatnio ze sobą sprzężona. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że wzrost poziomu OPG w stanach zapalnych stanowi reakcję obronną organizmu na patologiczny proces resorpcji kości.

WNIOSKI

Wzrost ekspresji RANKL w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych oraz torbielach zawiązkowych jest indukowany przez ekspansję tych zmian. Uzyskane wyniki badań immunohistochemicz-

nych świadczą o wpływie RANKL i OPG na przebieg procesu resorpcji kości w szczęcie i zuchwie. Nasze obserwacje są fragmentem całego procesu niszczenia kości i dla potwierdzenia wymagają dalszych badań na większej grupie chorych. □

Piśmiennictwo

- Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD: Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000; 14: 158-172.
- Kryśkiewicz E, Lorenc RS: Szlak RANKL/RANK/OPG i jego znaczenie w fizjologii i patofizjologii kości. *Terapia* 2006; 14: 58-63.
- Stawińska N, Ziętek M, Kochanowska I: Molekularne procesy resorpcji kości i ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób przyzębia i osteoporozy. *Dent Med Probl* 2005; 42: 627-635.
- Witkowska-Zimny M, Wróbel E, Przybylski J: Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy. *Post Biol Kom* 2009; 36(4): 695-705.
- Kuczowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Łycka-Świeszewska E: Expression of the receptor activator for nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in chronic otitis media. *Am J Otolaryngol* 2010; 31(6): 404-409.
- Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001; 92(3): 460-470.
- Boyce BF, Yao Z, Xing L: Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2009; 19(3): 171-180.
- Boyce BF, Xing L: Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473(2): 139-146.
- Stanisławowski M, Kmieć Z: Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Post Hig Med Dosw* 2009; 63: 234-241.
- Zdzisińska B, Kandefer-Szerszeń M: Rola RANK/RANKL i OPG w szpiczaku plazmocytowym. *Post Hig Med Dosw* 2006; 60: 471-482.
- Ostrowska Z, Kos-Kudła B, Szapska B et al.: Wpływ leptyny na tkankę kostną. *Endokrynol Otył Zab Przem Mat* 2008; 4(3): 26-29.
- Meredino D, Costanza D, Maggio C et al.: The role of OPG, RANK, RANKL in the bone metabolism, cardiovascular disease and immune system: clinical and physiopathological implication. *Acta Med Mediter* 2006; 22: 19-27.
- Baker PJ: The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect* 2000; 2(10): 1181-1192.
- García CC, Diago MP, Mira BG et al.: Expression of cytokeratins in epithelialized periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107: 43-46.
- Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB et al.: Receptor activator NF κ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(3): 404-409.
- Suzuki T, Kumamoto H, Kunimori K, Ooya K: Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(1): 46-52.
- Crotti T, Smith MD, Hirsch R et al.: Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontol Res* 2003; 38: 380-387.
- Menezes R, Garlet TP, Letra A et al.: Differential patterns of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod* 2008; 34(8): 932-938.
- Rittling SR, Zetterberg C, Yagiz K et al.: Protective role of osteopontin in endodontic infection. *Immunology* 2010; 129(1): 105-114.

nadesłano: 16.10.2013

zaakceptowano do druku: 14.11.2013

Adres do korespondencji:

*Michał Ratajczak

Klinika Chirurgii Szczękowo-Twarzowej

i Stomatologicznej GUMed

ul. Smoluchowskiego 17, 80-214 Gdańsk

tel.: +48 507-068-302

e-mail: ratajczak@gumed.edu.pl