

MICHAŁ RATAJCZAK

**SZLAK RANKL/RANK/OPG W PRZEWLEKŁYCH
ZAPALENIACH TKANEK
OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH
W SZCZĘCE I ŻUCHWIE**

PRACA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Z KATEDRY I KLINIKI CHIRURGII SZCZĘKOWO-
TWARZOWEJ I STOMATOLOGICZNEJ GDAŃSKIEGO
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO

PROMOTOR: DR HAB. MED. JERZY KUCZKOWSKI

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

GDAŃSK, 2011

Panu Dr hab. med. Jerzemu Kuczkowskiemu

za temat i pomoc w realizacji pracy, cenne uwagi i wskazówki,

Panu Profesorowi dr hab. Adamowi Włodarkiewiczowi

za motywację i wsparcie,

Panu Profesorowi dr hab. med. Tadeuszowi Pawełczykowi

oraz Pani Dr n. med. Monice Sakowicz – Burkiewicz

za okazaną życzliwość i nieocenioną pomoc w realizacji badań,

Pani Dr n. med. Grażynie Kobierskiej – Gulidzie

za pomoc w realizacji pracy,

Pani Dr n. med. Jadwidze Gawrońskiej – Skorkowskiej

oraz pracownikom Poradni Chirurgii Stomatologicznej GUMed

za życzliwość i wspianą atmosferę w pracy

Serdecznie dziękuję!

Niniejszą pracę dedykuję

Rodzinie!

Objaśnienia stosowanych skrótów i symboli

AP1 – czynnik transkrypcyjny (*ang. Activator Protein – 1*)

ASK1 – kinaza regulująca apoptozę (*ang. Apoptosis Signal – Regulating Kinase – 1*)

BCIP – fosforan bromo-chloro-indolu (substrat dla alkalicznej fosfatazy) (*ang. Bromo-Chloro-Indolyl-Phosphate*)

BOB – bufor obciążający do elektroforezy białkowej

BSA – albumina wołowa (*ang. Bovine Serum Albumine*)

DDH – domeny homologiczne do domen śmierci (*ang. Death Domain Homologous Regions*)

EDTA – sól sodowa kwasu etylenodwuaminoczworoocowego (*ang. Ethylenediamine Tetra Acid*)

ELAM-1 – E – selektywna (*ang. Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule*)

FGF – czynniki wzrostu fibroblastów (*ang. Fibroblast Growth Factor*)

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (*ang. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

ICAM-1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1 (*ang. Inter Cellular Adhesion Molecule 1*)

IFN – interferon

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (*ang. Insulin-Like Growth Factor 1*)

IL – interleukina

JNK – N-końcową domenę białka c-Jun (*ang. Jun N-terminal Kinase*)

LPS – lipopolisacharydy

MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów (*ang. Monocyte Chemotactic Protein-1*)

M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (*ang. Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MMP – metaloproteinazy (*ang. Metalloproteinases*)

NBT – błękit tetrazoliowy (substrat dla alkalicznej fosfatazy) (*ang. Nitro Blue Tetrazolium*)

NF_κB – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF_κB (*ang. Nuclear Factor κB*)

NIK - NF_κB – kinaza indukująca NF_κB (*ang. NF_κB - Inducing Kinase*)

OCIF – czynnik hamujący osteoklastogenezę (*ang. Osteoclastogenesis Inhibitory Factor*)

OCPs – precursory osteoklastów (*ang. Osteoclast Precursors*)

OPG – Osteoprotegeryna (*ang. Osteoprotegerin*)

OSM – onkostatyna M (*ang. Oncostatin M*)

PGE₂ – prostaglandyna E2 (*ang. Prostaglandin E2*)

PMN – granulocyty wielojądrzaste (*ang. Polymorphonuclear Leukocytes*)

RANK – receptor aktywujący jądrowy czynnik NF_κB (*ang. Receptor Activator of Nuclear Factor κB*)

RANKL – ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF_κB (*ang. Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand*)

RANTES – chemokiny CCL5 (*ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*)

RT-PCR - łańcuchowa reakcja polimerazowa w czasie rzeczywistym (*ang. Real – Time PCR*)

TGF β – transformujący czynnik wzrostu β (*Transforming Growth Factor β*)

TNF – czynnik martwicy nowotworu (*ang. Tumor Necrosis Factor*)

TNFR – receptor czynnika martwicy nowotworu (*ang. Tumor Necrosis Factor Receptor*)

TRAF - białka adaptorowe (*ang. TNF Receptor-Associated Factors*)

SPIS TREŚCI

1. Streszczenie	9
2. Wstęp	15
2.1 Zmiany okołowierzchołkowe szczęki i żuchwy	16
2.2 Klasyfikacja torbieli zębopochodnych i zapalnych	17
2.3 Diagnostyka radiologiczna zmian okołowierzchołkowych	26
2.4 Diagnostyka histopatologiczna, immunohistochemiczna i molekularna	29
2.5 Fizjologia resorpcji kości	30
2.5.1 Osteoklasty, osteoblasty, prostaglandyny interleukiny-1 α , 6, 11,	31
2.6 Charakterystyka molekularna zmian okołowierzchołkowych ..	38
2.6.1 Zakażenie bakteryjne. Lipopolisacharydy.....	38
2.6.2 Odpowiedź gospodarza (Limfocyty T, B, granulocyty obojętnochłonne, leukotrieny, immunoglobuliny, prostaglandyny, metaloproteinazy)	39
2.6.3 Szlak RANKL/RANK/OPG	43
2.6.3.1 Osteoprotegeryna (OPG)	43
2.6.3.2 Ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF κ B (RANKL)	45
2.6.3.3 Receptor aktywujący jądrowy czynnik- κ B (RANK).....	47
2.6.3.4 Kaskada sygnałów RANK-RANKL	48
2.7 Leczenie zmian okołowierzchołkowych	50

3. Cel pracy	51
4. Materiał i metody	52
4.1 Pacjenci i materiał do badań	52
4.2 Metodyka badań molekularnych	53
4.2.1 Bufory i odczynniki	53
4.2.2 Pomiar stężenia białka	53
4.2.3 Przygotowanie ekstraktów białkowych	53
4.2.4 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym	54
4.3 Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne	55
4.3.1 Metoda badań immunohistochemicznych	55
4.3.2 Pierwotne przeciwciała	56
4.4 Statystyka	56
5. Wyniki badań	57
5.1 Materiał tkankowy.....	57
5.2 Wynik badań podmiotowych i przedmiotowych.....	60
5.3 Wyniki badań immunohistochemicznych.....	61
5.4 Wyniki badań molekularnych	65
6. Omówienie wyników badań i dyskusja	74
7. Wnioski	81
8. Piśmiennictwo	82
9. Załączniki	100

1. Streszczenie

Zmiany okołowierzchołkowe zębów charakteryzują się niszczeniem kości przez osteoklasty kontrolowane przez receptor aktywatora jądrowego czynnika NF- κ B (RANK) i jego ligand (RANKL). W zmianach tych zostaje zaburzony stosunek RANKL/OPG prowadzący do patologicznej resorpcji kości. Interleukina - 1 α (IL-1 α) podtrzymuje stan zapalny oraz stymuluje osteoklasty.

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 do badań uzyskano od 40 chorych (28 mężczyzn i 12 kobiet) ze zmianami okołowierzchołkowymi zębów leczonych w Poradni Chirurgii Szcękowej i Stomatologicznej GUMed. Grupą kontrolną był materiał tkankowy zdrowej błony śluzowej jamy ustnej uzyskany od 10 chorych leczonych z powodu zespołu bezdechów sennych (OSAS). Materiał tkankowy do badań został utrwalony a następnie poddany badaniom histopatologicznym, immunohistochemicznym i molekularnym. Ocenę histopatologiczną wykonano po barwieniu hematoksyliną i eozyną. Obecność tkankową RANKL i OPG wykazano metodą immunohistochemiczną u 36 chorych: 14 ziarniniaków okołowierzchołkowych, 17 torbieli korzeniowych oraz 5 torbieli zawiązkowych. Poziom ekspresji oceniano w odniesieniu do ilości immunoreaktywnych komórek. Białko RANKL i OPG widoczne było przede wszystkim w warstwie cytoplazmatycznej komórek zapalnych. Ekspresję RANKL stwierdzono we wszystkich badanych zmianach okołowierzchołkowych, niemal we wszystkich subpopulacjach komórek. Wysoki poziom białka RANKL wykazano w 11 (30%) torbielach

zapalnych, 8 (22%) ziarniniakach okołowierzchołkowych i 4 (11%) torbielach zawiązkowych; średni w 6 (17%) ziarniniakach i w 6 (17%) torbielach korzeniowych oraz w 1 (3%) torbieli zawiązkowej. Ekspresja OPG w badanych zmianach była na niskim poziomie u 9 (25%) a na średnim u 27 (75%) chorych. Średni poziom ekspresji występował przede wszystkim w torbielach korzeniowych (n=13, 36%), niski w komórkach ziarniniaków okołowierzchołkowych (n=5, 14%). Wszystkie zmiany o charakterze torbieli zawiązkowej wykazywały ekspresję OPG na średnim poziomie.

Ekspresja białek RANKL, OPG i IL-1 α oceniono metodą Western blot z białkiem referencyjnym p14-3-3. Badania przeprowadzono na utrwalonych próbkach tkankowych: 16 ziarniniaków okołowierzchołkowych, 19 torbieli korzeniowych, 5 torbieli zawiązkowych oraz 10 próbkach kontrolnych. Wykazano wzrost ekspresji RANKL, OPG i IL-1 α w badanych tkankach w porównaniu do grupy kontrolnej. Poziom ekspresji RANKL w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbieli korzeniowej i torbieli zawiązkowej w znacznym stopniu przewyższał poziom ekspresji tych białek w grupie kontrolnej. Stwierdzono niewielki wzrost poziomu białka OPG w zmianach okołowierzchołkowych, ale nie był on znamieny statystycznie. Porównanie poziomu białek RANKL, OPG i stosunku RANKL/OPG w rodzajach zmian chorobowych nie wykazało istotnych statystycznie różnic. Zaobserwowano niewielki wzrost poziomu białka RANKL, natomiast spadek OPG w torbieli zapalnej w porównaniu do ziarniniaka. W torbieli zawiązkowej, zarówno ekspresja RANKL, jak i OPG była na niskim poziomie. Stosunek RANKL/OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i torbielach zawiązkowych, był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej. Stwierdzono wzrost ekspresji IL-1 α w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

Nie wykazano znamienych statystycznie różnic ekspresji IL-1 α w poszczególnych rodzajach zmian chorobowych.

Zwiększona ekspresja RANKL, OPG i IL-1 α w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i torbielach zawiązkowych dowodzi ich roli w procesie resorpcji kości. Wzrost ekspresji IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych wpływa na wzrost aktywności czynnika RANKL prowadzącego do intensyfikacji procesu różnicowania osteoklastów. Wzrost ekspresji OPG w zmianach okołowierzchołkowych może świadczyć, o reakcji obronnej organizmu przed degradacją kości. Uzyskane wyniki badań immunohistochemicznych i molekularnych świadczą o wpływie RANKL, OPG i IL-1 α na przebieg procesu resorpcji kości w szczęce i żuchwie.

Summary

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). In these changes the ratio RANKL/OPG is disturbed which leads to the pathological bone resorption. Interleukin - 1 α (IL-1 α) sustains inflammation and stimulates osteoclasts.

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. The research material was obtained from 40 patients (28 men and 12 women) with periapical lesions of teeth treated in the Dental and Maxillofacial Surgery Clinic of GUMed. Control group tissue material consisted of healthy tissue of oral mucous membrane obtained from 10 patients treated for sleep apnea syndrome (OSAS).

Tissue material for research was captured and then subjected to histopathological, immunohistochemistry and molecular examination. Histopathological evaluation was performed after staining with hematoxylin and eosin. The presence of RANKL and OPG tissue was demonstrated by immunohistochemistry in 36 patients: 14 periapical granulomas, 17 radicular cysts and 5 follicular cysts. The level of expression was assessed in relation to the amount of immunoreactive cells. RANKL and OPG protein was visible primarily in the cytoplasmic layer of inflammatory cells. RANKL expression was seen in all subjected periapical lesions, almost all subpopulations of cells.

High level of RANKL protein was demonstrated in 11 (30%) inflammatory cysts, 8 (22%) periapical granulomas and 4 (11%) follicular cysts; medium level in 6 (17%) granulomas and 6 (17%) radicular cysts and 1 (3%) follicular cyst. Expression of OPG in the studied lesions was low in 9

(25%) and on average in 27 (75%) patients. The average level of expression occurred primarily in the radicular cysts (n = 13, 36%), low in the cells of periapical granulomas (n = 5, 14%). All the changes of a follicular cyst showed the expression of OPG on the medium level.

Expression of the protein RANKL, OPG and IL-1 α was evaluated by Western blot with the reference protein p14-3-3. The study was conducted on fixed tissue samples: 16 periapical granulomas, 19 radicular cysts, 5 primordial cysts and 10 control samples. The increase of expression of RANKL, OPG and IL-1 α has been shown in the tissues examined as compared to the control group.

The level of RANKL expression in periapical granulomas, radicular cysts and follicular cysts significantly exceeded the level of expression of these proteins in the control group. A slight increase in protein levels of OPG in periapical lesions was observed, but it was not statistically significant. Comparison of protein levels of RANKL, OPG and RANKL/OPG ratio in the three types of lesions showed no statistically significant differences. A slight increase in level of protein RANKL was observed as well as an OPG decrease in inflammatory cysts compared to granulomas. In the follicular cysts, both the expression of RANKL and OPG were low. The ratio of RANKL/OPG in periapical granulomas, radicular cysts and follicular cysts was significantly higher than in the control group. An increase in expression of IL-1 α in the study group compared with the control group was shown. There were no significant statistical differences of IL-1 α expression in particular types of lesions.

As shown in studies, increased expression of RANKL, OPG and IL-1 α in periapical granulomas, radicular cysts and follicular cysts demonstrates their role in the process of bone resorption. The increase in IL-1 α expression in periapical changes affects the enhance of RANKL activity

leading to increased osteoclast differentiation process. Increased expression of OPG in periapical lesions may render the body's defense reaction against degradation of bone. The obtained results of immunohistochemistry and molecular evidence of the impact of RANKL, OPG and IL-1 α on the process of bone resorption in the maxilla and mandible.

2. Wstęp

Kość jest tkanką, która ulega ciągłej przebudowie. Głównymi procesami metabolicznymi w kości są: proces modelowania i dojrzewania, (okres dzieciństwa) polegający na wymianie składników kośćca, oraz remodelacja (po 30 roku życia) czyli wewnętrzna przebudowa kości (*ang. bone remodeling*), po zakończeniu wzrostu i osiągnięciu szczytowej masy tkanki kostnej (*ang. peak bone mass*). Proces modelacji prowadzi do tworzenia nowej kości. Podczas tego procesu kość wzrasta na długość, grubość oraz osiąga docelowy kształt. W szczególny sposób procesowi temu poddawany jest w okresie wzrostu wyrostek zębodołowy szczęki i żuchwy. Remodelacja warunkuje właściwości regeneracyjne kości. Modelowanie i przebudowa kości występują po procesach resorpcji i kościotworzenia. Przeciętnie po 40. roku życia rozpoczyna się fizjologiczny proces zmniejszania masy kostnej. Szybkość utraty tkanki kostnej szacuje się od 0,5 – 1%, a u kobiet po menopauzie może sięgać nawet 5% w skali rocznej. W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy nawarstwianiem a resorpcją kości. Równowaga ta może zostać zaburzona w wielu chorobach układu kostnego, takich jak osteoporoza, choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, szpiczak mnogi oraz przerzuty nowotworowe do kości. W tych chorobach dochodzi do zwiększenia aktywności osteoklastów z jednoczesnym obniżeniem aktywności osteoblastów, prowadzących do patologicznego ubytku masy kostnej. Na straży dojrzewania i funkcjonowania osteoklastów stoi szlak RANK/RANKL/OPG, którego głównymi składnikami są: osteoprotegeryna (OPG - *ang. Osteoprotegerin*), receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B (RANK- *ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B*) oraz ligand RANK (RANKL- *ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF- κ B Ligand*). Wśród chorób kości szczęki i żuchwy często występują zmiany

okołowierzchołkowe o charakterze zapalnym, rozwijające się na skutek infekcji bakteryjnej kanałów korzeniowych. Zmianom tym towarzyszy utrata prawidłowej struktury kostnej szczęk. Z powodu bezobjawowego wzrostu zmiany mogą osiągać duże rozmiary, doprowadzając do deformacji i niszczenia otaczającej je kości. Poznanie patomechanizmu powstawania zmian okołowierzchołkowych może być przydatne tak w rozpoznawaniu jak i w zapobieganiu oraz leczeniu tych chorób.

2.1 Zmiany okołowierzchołkowe szczęki i żuchwy

Choroby okołowierzchołkowe doprowadzają do zniszczenia struktur utrzymujących ząb w kości wyrostka zębodołowego oraz do resorpcji kości (1). Głównym inicjatorem procesów zapalnych w okolicy przywierzchołkowej zębów, jest infekcja mieszaną florą bakteryjną pochodząca z kanału zębowego (2). Do rozwoju zapalenia może również dojść na skutek przypadkowego urazu, podrażnienia chemicznego oębnej podczas leczenia endodontycznego. W pierwszym okresie proces ogranicza się do okolicy więzadła przyzębnego oraz kości gąbczastej. Zachodzą tu procesy zapalne takie jak reakcja nerwowo-naczyniowa, która objawia się przekrwieniem, zatorami naczyń, obrzękiem więzadeł oraz nagromadzeniem granulocytów obojętnochłonnych (3). Przedostawanie się bakterii i ich toksyn poza otwór wierzchołkowy zęba powoduje napływ, aktywację oraz interakcje pomiędzy komórkami zapalnymi i obronnymi organizmu (3, 4, 5). Procesy obronne prowadzą nie tylko do niszczenia patogenów, ale również do resorpcji otaczającej ząb kości (4, 6). Miejsce po zresorbowanej kości zastępowane jest przez ziarninę, która może w przebiegu nieleczzonego zapalenia organizować się w zmiany o charakterze torbieli korzeniowych (4, 5, 7). Zapalenie okołowierzchołkowe może być wywołane przez bakterie zakażające kanał zęba (3, 6). Drobnoustroje,

które indukują powstawanie procesów zapalnych w obrębie miazgi zęba oraz okolicy okołowierzchołkowej to przede wszystkim beztlenowce takie jak gram ujemne: *Fusobacterium*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, oraz gram dodatnie: *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium* i *Actinomyces actinomycetemcomitans* (6, 7). Bakterie te różnią się od siebie zjadliwością i mogą zwiększać lub zmniejszać stopień wirulencji. Właściwości chorobotwórcze bakterii znajdujących się w kanale zębowym modyfikowane są przez interakcje z innymi drobnoustrojami w kanale zęba (7); zdolność do zakłócania i omijania mechanizmów obronnych organizmu; uwalnianie lipopolisacharydów (LPS) oraz syntezę enzymów degradujących tkanki gospodarza (3).

2.2 Klasyfikacja torbieli zębopochodnych i zapalnych

W 1654 roku po raz pierwszy opisano deformację kości szczęk spowodowaną zmianą torbielowatą, lecz dopiero w 1728 roku zasugerowano, że tego typu zmiany mogą mieć związek z zębami. W 1853 roku James Paget wprowadził termin „torbiele zawiązkowe”, który odnosił się do wszystkich typów zmian torbielowatych pochodzenia zębowego. W publikacji Malasseza z 1885 roku dotycząca resztek komórek nabłonkowych zasugerowano, że mogą one mieć związek z tworzeniem torbieli. W 1898 roku JG Turner po przeprowadzeniu licznych badań nad ziarniniakami związanymi z pozbawionymi miazgi zębami wykazał ich znaczenie w tworzeniu zmian o charakterze torbieli. Nadał im nazwę „nabłonkowe guzy korzeni zębów” (8). W 1971 roku WHO opublikowała pierwszą powszechnie uznaną klasyfikację guzów zębopochodnych, torbieli i innych zmian charakterystycznych dla kości szczęk. Publikacja była wynikiem długoletniej współpracy pomiędzy WHO a Zakładem Patologii Jamy Ustnej Królewskiej Szkoły Dentystycznej w Kopenhadze.

Jej głównymi autorami byli Kramer i Pindborg. Ci sami autorzy, do których dołączył patolog Shear w 1992 roku wzięli udział w tworzeniu drugiego wydania tej publikacji - „*WHO Histological Typing of Odontogenic Tumors*”. Opracowanie z 1992 roku ujednoliciło terminologię, co ułatwiło komunikację między klinicystami a patologiami. W nowej klasyfikacji uwzględniono nowe informacje na temat zmian zębopochodnych, które uzyskano dzięki nowoczesnym technikom badawczym, uwzględniono w niej także dane kliniczne i wprowadzono wyniki analiz immunohistochemicznych (*Tabela I i II*). W 2005 roku ukazała się kolejna klasyfikacja, której głównym autorem był Leon Barnes. Proponowany przez niego podział różni się od poprzedniego; przede wszystkim zostały usunięte z niego torbiele zębopochodne. Najistotniejszą modyfikacją było zakwalifikowanie torbieli rogowaciejącej (keratocysty) do grupy nowotworów. W związku z brakiem nowego podziału torbieli, obecnie za obowiązującą uważa się klasyfikację z 1992 roku (9, 10, 11).

Tabela I. Klasyfikacja torbieli nabłonkowych wg. WHO z 1971 roku

A. Rozwojowe

1. Zębopochodne

- a. Torbiel dziąsłowa - cystis gingivalis
- b. Torbiel przyzębna - cystis parodontalis
- c. Torbiel zawiązkowa - cystis follicularis

2. Niezębopochodne

- a. Torbiel przewodu nosowo – podniebiennego - Naso-palatine duct (incisive canal) cyst
- b. Torbiel gałeczkowo – szczękowa - cystis globulomaxillaris
- c. Torbiel nosowo – wargowa - cystis nosolabialis

B. Zapalne

- 1. Torbiel korzeniowa - cystis radicularis

Tabela II. Klasyfikacja torbieli nabłonkowych wg. WHO z 1992 roku

A. Rozwojowe

1. Zębopochodne

- a. "Torbiel dziąsłowa" noworodków - "Gingival Cyst" Of Infants (Epstein Pearls)
- b. Torbiel rogowaciejąca (pierwotna) - Odontogenic Keratocyst (Primordial Cyst)
- c. Torbiel zawiązkowa - Dentigerous (Follicular) Cyst
- d. Torbiel nad wyrzynającym się zębem - Eruption Cyst
- e. Torbiel przyzębna boczna - Lateral Periodontal Cyst
- f. Torbiel dziąsłowa dorosłych - Gingival Cyst In Adults
- g. Torbiel gruczołowa zębopochodna/torbiel ślinowo-zębopochodna - Glandular Odontogenic Cyst; Sialo-Odontogenic Cyst

2. Niezębopochodne

- a. Torbiel przewodu nosowo – podniebiennego (kanału przysiecznego) - Nasopalatine Duct (Incisive Canal) Cyst
- b. Torbiel nosowo-wargowa (nosowo – wyrostkowa) - Nasolabial (Nasoalveolar) Cyst

B. Zapalne

- a. Torbiel korzeniowa okołowierzchołkowa lub boczna - Radicular Cyst Apical And Lateral
- b. Torbiel resztkowa - Residual
- c. Torbiel przyzębna zapalna - Paradental (Inflammatory Collateral, Mandibular Infected Buccal) Cyst

Rozwój tych zmian jest w początkowych etapach bezobjawowy, jednak może prowadzić do niszczenia struktury kostnej, deformacji twarzy i patologicznych złamań kości. Spośród torbieli zębopochodnych najczęściej rozpoznawalna jest torbiel korzeniowa (*cystis radicularis*). **Wzrost torbieli korzeniowej wiąże się zawsze z resorpcją otaczającej kości (12, 13, 14).** Częstość występowania torbieli zębopochodnych szacuje się na 7 - 15% spośród wszystkich zmian okołowierzchołkowych szczęki i żuchwy (12, 15).

Najczęściej występuje torbiel korzeniowa, która stanowiła ponad 60% rozpoznań (15, 16, 17). Na drugim miejscu, w ponad 30% przypadków, są zmiany torbielowate klasyfikowane jako torbiele zawiązkowe (16, 17). Zgodnie z definicją, torbiel to jedno lub wielokomorowa patologiczna jama w obrębie kości lub tkanek miękkich, wypełniona treścią o różnej spistości (płynnej, półpłynnej lub gazowej), która nie powstaje na skutek kumulacji ropy (14, 16, 18). Torbiele zapalne są bezpośrednią konsekwencją przewlekłego zapalenia tkanek okołowierzchołkowych, jednak nie wszystkie przewlekłe zmiany muszą się w nią przekształcić (15, 19). Torbiel korzeniowa rozwija się z resztek komórek nabłonkowych znajdujących się w okolicy okołowierzchołkowej zębów. Komórki nabłonkowe pobudzone są do proliferacji przez zapalenie, które jest wynikiem martwiczych resztek oraz bakteryjnych antygenów pochodzących z nekrotycznej miazgi (15). Rozrost nabłonka mogą stymulować bakterie: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Escherichia coli* (14, 20, 21). Torbiele w całości lub częściowo pokryte są nabłonkiem wielowarstwowym płaskim z tendencją do rogowacenia. Jego charakter zależy od wieku, stopnia zróżnicowania torbieli lub stopnia zaawansowania zapalenia. W młodych torbielach nabłonek może wykazywać cechy zapalne i proliferację (16, 20). Brak wyściółki nabłonkowej jest cechą charakterystyczną dla torbieli rzekomych (14, 16).

Torbiele korzeniowe występują w dwóch formach: torbiel prawdziwa (ang. apical true cyst) oraz torbiel kieszeniowa (ang. apical pocket cyst) (3, 15, 20). Torbiel prawdziwa jest zmianą okołowierzchołkową, której patologiczna jama jest całkowicie zamknięta przez wyściełający ją nabłonek (15). Torbiel prawdziwą opisuje się jako zmianę powstałą bezpośrednio z ziarniniaka okołowierzchołkowego (3, 15) w trzech następujących po sobie fazach (19).

Cechą charakterystyczną torbieli kieszeniowej jest to, że jej jama stanowi przedłużenie kanału korzeniowego zainfekowanego zęba. Rozwój torbieli kieszeniowej najprawdopodobniej inicjowany jest przez gromadzenie się granulocytów obojętnochłonnych w okolicy wierzchołka korzenia zęba, w odpowiedzi na infekcję bakteryjną z zakażonego kanału zębowego. Utworzona w ten sposób jama ropnia wyścielona jest przez proliferujący nabłonek, który łącząc się z wierzchołkiem korzenia tworzy otaczający go kołnierz z przyczepem nabłonkowym. Izoluje tym samym zakażony kanał oraz jamę ropnia od środowiska (3, 15).

Torbiele początkowo rozwijają się bezobjawowo – na tym etapie najczęściej wykrywane są przypadkowo podczas wykonywania zdjęć radiologicznych (22). Wraz ze wzrostem pojawia się zgrubienie w postaci guza na wyrostku zębodołowym, a w późniejszym okresie może dojść do deformacja twarzy. Brak oporu kostnego – objawia się tzw. trzeszczeniem pergaminowym – crepitatio, czyli objawem Dupuytrena. Rozrost torbieli może prowadzić do przemieszczenia sąsiednich zębów i zaburzenia czucia. Na podstawie zdjęcia rentgenowskiego wstępne rozpoznanie torbieli można postawić, gdy średnica zmiany jest większa lub równa 1 cm (20, 22, 23). Ostateczne rozpoznanie jest możliwe dopiero na podstawie badania histopatologicznego (22).

Wyróżnia się trzy fazy rozwoju torbieli korzeniowej: **1. Faza inicjacji, 2. Faza formowania, 3. Faza wzrostu (20).**

Ad.1) Faza inicjacji: Jest to okres podczas którego dochodzi do proliferacji komórek nabłonkowych *Malassezia* pod wpływem działania endotoksyn bakteryjnych pochodzących z martwej miazgi (24). Badania wykazały, że *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* oraz *Escherichia coli* mogą bezpośrednio stymulować rozrost nabłonka. W patogenezę zaangażowana jest również immunologiczna odpowiedź komórkowa o czym świadczy naciek limfocytów T (20). Ważną rolę w proliferacji nabłonka odgrywają immunoglobuliny. Dominującą immunoglobuliną (produkowaną przez komórki zapalne ziarniniaków okołowierzchołkowych) jest: IgG (ok. 74%), IgA (20%), IgE (4%), IgM (2%) (20). Na skutek reakcji i tworzenia kompleksów antygen – przeciwciało wzrasta przepuszczalność ścian naczyń oraz pojawia się odpowiedź immunologiczna. Obecność IgE oraz komórek tucznych sugeruje reakcję anafilaktyczną (20). Komórki pomocnicze T (CD4, T_H), poprzez wydzielanie IL-2, pełnią rolę w różnicowaniu limfocytów B w komórki plazmatyczne produkujące immunoglobuliny, jak również w procesie aktywacji komórek T cytotoksycznych – supresorowych (CD8, T_S). Stosunek ilościowy CD4 do CD8 jest różny w zależności od stopnia rozwoju zmiany (25, 26). Komórki T oraz T_H dominują nad komórkami T_S w ziarniniakach okołowierzchołkowych, natomiast w torbielach znacznie wzrasta ilość komórek plazmatycznych, co pozwala przypuszczać, że w torbielach istotną rolę odgrywa odpowiedź humoralna (25, 26, 27). W warstwie nabłonkowej i naczyniowej torbieli występują interleukiny IL-1 α , IL-1 β , IL-6. IL-1 β oraz IL-6, które stymulują proliferację komórek nabłonkowych (28). W komórkach nabłonka i śródbłonka wykazano obecność ELAM-1 (Endothelium Leukocyte Adhesion Molecule 1/E-selektyna) oraz ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule 1/międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1), które są bardzo ważne w procesie resorpcji kości, oraz

prolifracji nabłonka (20, 29).

Ad.2) Faza formowania: Na tym etapie jama torbieli zostaje wysłana proliferującym nabłonkiem zębopochodnym. Wyróżniono dwie możliwe teorie formowania torbieli. **I. „Teoria niedoboru czynników odżywczych”** opiera się na założeniu, że centralnie położone komórki nabłonka w ziarniniakach na skutek odcięcia źródła pokarmu ulegają martwicy i degradacji, co z kolei przyciąga granulocyty obojętnochłonne do obszaru martwiczego. Tworzą się mikrojamy zawierające komórki zapalne i zdegenerowane komórki nabłonka, które następnie zlewają się w jamę torbieli wysłaną nabłonkiem wielowarstwowym płaskim (3). W centralnych komórkach ziarniniaków oraz w złączającym się nabłonku wykazano wysoki poziom kwaśnej fosfatazy oraz słabą aktywność proteolityczną. **II. Druga teoria zwana „teorią ropnia”** zakłada, że proliferujący nabłonek wyściela jamę ropnia powstałą z rozpadu tkanek. Teoria ta wykorzystuje właściwość komórek nabłonka polegającą na wyścielaniu odkrytych powierzchni tkanek łącznych. Istnieją również teorie, że komórki centralne ziarniniaków obumierają na skutek reakcji immunologicznych (3).

Ad.3) Faza wzrostu: We wzroście torbieli istotną rolę odgrywa osmoza. Produkty lizy komórek nabłonkowych i zapalnych w jamie torbieli powodują powstawanie licznych małych molekuł, które podnoszą ciśnienie osmotyczne torbieli. W 1966 Toller przeprowadził „in vivo” dyfuzję radioaktywnego krystaloidu oraz promieniotwórczego koloidu. Wykazał szybką dyfuzję krystaloidu oraz tendencję do zatrzymywania koloidu. Oznacza to, że ściana torbieli ma właściwości błony półprzepuszczalnej, nie jest jednak identyczna ze ścianami kapilar, bądź ścianami komórek ze względu na liczne warstwy

komórkowe o różnych funkcjach (śródbłonek, substancja podstawowa, nabłonek (8). Przyjęto, że ciśnienie hydrostatyczne ma wpływ na wzrost torbieli. Teoria ta obowiązuje do dnia dzisiejszego, zmianie uległy jedynie niektóre jej aspekty. Obecnie uważa się, że ciśnienie osmotyczne ma wpływ na rozrost torbieli jedynie w pierwszej fazie formowania (20). Proliferacja nabłonka trwa tak długo, jak długo występują impulsy zapalne. Im większa torbiel tym rośnie wolniej. Wzrostowi torbieli zawsze towarzyszy resorpcja otaczającej kości.

Liczne badania wykazały ekspresję metaloproteinaz (MMP), które wpływają na rozwój i wzrost torbieli oraz posiadają zdolność degradacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej i biorą udział w procesie resorpcji tkanki kostnej (30, 31). Enzymy te są produkowane przez większość komórek (komórki nabłonka, fibroblasty, keratynocyty, komórki endotelium, osteoblasty, makrofagi i komórki nacieku zapalnego: monocyty, limfocyty jednojądrzaste, leukocyty) (32, 33, 34). 1. żelatynaza (MMP2, MMP9) – degraduje kolagen typu IV, V, VII, IX, fibronektynę i elastynę, działając synergistycznie z kolagenozami. 2. kolagenaza (MMP1, MMP8) – niszczy kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X (30, 34). MMP-1, MMP-2 oraz MMP-3 mają znaczenie także w procesie resorpcji tkanki kostnej. Mechanizm ich działania polega na degradacji niezmineralizowanych składników osteoidu oraz odsłonięciu części zmineralizowanej na działanie osteoklastów (27, 30). W przypadku powstania i wzrostu torbieli zębopochodnych rozpoczynają resorpcję struktury kostnej indukowanej poprzez bakterie, ich toksyny oraz czynnik zapalny dwoma drogami poprzez: 1. Produkty bakteryjne (endotoksyny, lipopolisacharydy i enzymy) stymulujące obecne i napływające komórki do produkcji i wydzielania metaloproteinaz. 2. Produkty bakteryjne wywołujące odpowiedź immunologiczną makrofagów, a także innych komórek nacieku zapalnego

uruchamiając kaskady cytokin zapalnych jak $TNF\alpha$, $TGF\beta$, IL-1, IL-6. Indukują one produkcję metaloproteinaz na drodze autokrynnej lub parakrynnej, pobudzają do produkcji MMPs także keratynocyty, fibroblasty, komórki nabłonka, osteoblasty (4, 27, 32).

Istotną rolę w resorpcji kości odgrywają cytokiny i chemokiny. Są one obecne w płynie i ścianie torbieli. Cytokiny: IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α , działają poprzez zwiększanie resorpcyjnej aktywności osteoklastów. Chemokiny: MCP-1 oraz RANTES (ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted), są odpowiedzialne za rekrutację leukocytów w miejsce stanu zapalnego oraz ich aktywację. Ponadto IL-1 i IL-6 odgrywają istotną rolę w proliferacji komórek nabłonkowych (21, 25, 35, 36).

2.3 Diagnostyka radiologiczna zmian okołowierzchołkowych

Badania radiologiczne stanowią istotny element w początkowej diagnostyce zmian kostnych szczęki i żuchwy. Torbiel korzeniowa najczęściej występująca w obrębie kości szczęk, uwidacznia się na zdjęciach rtg jako osteolityczny ubytek kostny z osteosklerotyczną otoczką (37, 38). Jest to jednokomorowa zmiana o kształcie okrągłym lub gruszkowatym. Otoczka osteosklerotyczna może jednak nie być widoczna jeżeli torbiel znajduje się w fazie intensywnego wzrostu, bądź doszło do zakażenia jej światła. W przypadku osiągnięcia większych rozmiarów, torbiel korzeniowa może doprowadzać do rozsuwania sąsiadujących z nią korzeni zębów, a nawet do ich resorpcji. Podobny obraz może dawać jednokomorowy szkliwiak, jednak w jego przypadku częściej dochodzi do rozsuwania korzeni zębów niż ich resorbowania (22, 39). Na podstawie zdjęcia rentgenowskiego niemożliwym jest odróżnienie torbieli od ziarniniaka. Podstawowym kryterium różnicującym tych dwóch zmian jest

ich wielkość. Przyjęto, że zmianę o średnicy przekraczającej 1 cm wstępnie klasyfikuje się jako torbiel (37) (*Rycina 1,2,3*).



Rycina. 1. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel zapalna żuchwy z otoczką osteosklerotyczna



Rycina 2. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel żuchwy okolicy kąta i ramienia żuchwy z zębem w jej świetle



Rycina 3. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel zapalna szczęki obejmująca obszar od zęba 13 do 26, penetrująca do zatok szczękowych prawej i lewej

2.4 Diagnostyka histopatologiczna, immunohistochemiczna i molekularna zmian okołowierzchołkowych

Zmiany zapalne okołowierzchołkowe zębów mogą rozwijać się w kierunku ziarniniaków lub torbieli korzeniowych (6). Ziarniniaki zostały podzielone na trzy podstawowe grupy: **zwykłe (granuloma simplex)** – składające się z ziarniny i włóknistej otoczki; **nabłonkowe (granuloma epitheliale)** – zawierające tkankę nabłonkową, które mogą przekształcać się w ziarniniak torbielowaty w wyniku zwyrodnienia tłuszczowego; **torbielowate (granuloma cysticum)** – w miejscu komórek powstają jamy wypełnione płynem surowicznym zawierającym rozpadłe komórki i kryształki cholesterolu, który stanowi podłoże do tworzenia się torbieli zębopochodnych (40). Badania mikroskopowe ziarniniaka wykazały, że jest to tkanka łączna o bogatym unaczynieniu, z komórkami nacieku zapalnego, której towarzyszy resorpcja kości. Tkanka ziarninowa stanowi przekrój wszystkich etapów zapalenia okołowierzchołkowego, zaczynając od ostrego zapalenia do całkowitej martwicy. W budowie ziarniniaka wyróżniono cztery strefy: strefa martwicy; strefa wysięku; strefa ziarniny; strefa włóknista (6). Dwie pierwsze strefy zdominowały liczne neutrofile, takie jak granulocyty obojętnochłonne, które stanowią pierwszą linię obrony przed infekcją z kanału korzeniowego (6). Strefa ziarniny jest bogata w limfocyty, komórki plazmatyczne, makrofagi, eozynofile i malejącą ilością neutrofilii. Fibroblasty, naczynia i włókna kolagenowe są charakterystyczne dla strefy włóknistej (6, 30).

Torbiele zębopochodne rozwijają się z przetrwałych komórek nabłonkowych Malasseza, które proliferują pod wpływem patologicznych bodźców. Woreczek torbieli zębopochodnej zbudowany jest z zewnętrznej warstwy łącznotkankowej, pośredniej naczyniowej i wewnętrznej

nabłonkowej. Warstwę nabłonkową stanowi nabłonek wielowarstwowy płaski z tendencją do rogowacenia, lub gdy torbiel znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie jamy nosa lub zatoki szczękowej - nabłonek cylindryczny. Torbiele wypełnia płyn o różnej gęstości, z charakterystyczną opalescencją kryształków cholesterolu, zawierający złuszczone nabłonek, limfocyty, krwinki czerwone, albuminy, globuliny (3, 8, 20).

2.5 Fizjologia resorpcji kości

Kość jest tkanką zbudowaną z elementów organicznych i mineralnych o bardzo dużej aktywności metabolicznej. Budowa warstwowa kości korowej i gąbczastej odpowiada funkcji jaką pełni ona w organizmie (40).

W okresie od 3 do 10 roku życia tkanka kostna jest wymieniana w 100%. W warunkach fizjologicznych rocznie wymianie ulega około 10% kości zbitej oraz 15 – 30% tkanki kości gąbczastej, która wykazuje większą podatność na czynniki wewnętrzne i zewnętrzne (32, 42). Wymiana składników kostnych nazywa się modelowaniem, który przypada na okres rozwoju człowieka. Jego istota polega na tworzeniu tkanki kostnej w miejscach odrębnych od jej resorpcji. Skutkuje to wzrostem kości na długość i szerokość (41, 43) do uzyskania docelowego kształtu i masy, przez co staje się ona bardziej odporna na naprężenia i naciski mechaniczne (32). Około 30 roku życia, tkanka kostna osiąga swą szczytową masę (*pick bone mass*). Po okresie modelowania zaczyna dominować remodelacja, czyli proces wewnętrznej przebudowy kości. Proces ten dotyczy zarówno kości korowej jak i gąbczastej, a jego zadanie polega na utrzymaniu stałej masy, regeneracji kości w przypadku uszkodzeń oraz kontrolowaniu gospodarki wapniowo – fosforanowej (32, 41). Wyrostki zębodołowe szczęki i żuchwy

ulegają szczególnie gwałtownemu procesowi remodelacji. Ma to znaczenie zarówno podczas wyrzynania się zębów, jak i w procesie żucia (44). Istotą modelowania i wewnętrznej przebudowy kości są następujące po sobie resorpcja i nawarstwianie kości. Cykl remodelowania kości rozpoczyna się od procesu resorpcji i trwa zwykle około 10 dni, po których w warunkach prawidłowych, następuje kilkumiesięczna odbudowa ubytku kostnego (1, 32, 45, 46). Oba procesy zachodzą w wyniku działania dwóch rodzajów komórek, powstałych w procesie osteoklastogenezy, komórek kościogubnych – osteoklastów oraz osteoblastów, czyli komórek kościotwórczych utworzonych podczas osteoblastogenezy. W warunkach fizjologicznych działanie tych komórek wymaga zachowania ścisłej równowagi (47, 48).

2.5.1 Osteoklasty, osteoblasty, prostaglandyny, interleukiny - 1 α , 6, 11.

Osteoklasty to duże komórki kostne (o średnicy od 50 – 100 μ m), zawierające od 2 do 100 jąder, które posiadają zdolność resorbowania kości. (49, 50). Prekursorami osteoklastów (OCPs) są hematopoetyczne komórki wywodzące się z linii komórkowej makrofagów i monocytów (32, 49, 51, 52, 53). Proces ich dojrzewania przebiega na powierzchni lub w pobliżu kości, gdzie dostają się z krwioobiegu (32). W pierwszym etapie różnicowania osteoklastów główną rolę spełnia czynnik transkrypcyjny PU.1 (43, 54), który wpływając na powstawanie późnych komórek monocytarnych równocześnie odpowiada za nieswoiste różnicowanie wczesnych komórek monocytarnych (45). Za proliferację oraz przeżywanie prekursorów osteoklastów, jak również aktywność dojrzałych osteoklastów odpowiada związany z błoną komórkową lub występujący w postaci rozpuszczonej polipeptydowy czynnik M-CSF (*ang. Macrophage*

Colony-Stimulating Factor) (45, 55, 56). Ta cytokina wydzielana jest przez komórki zrębu szpiku oraz osteoblasty, działa poprzez receptor c-Fms, który wykazuje budowę transbłonowej kinazy Fms. (46, 55) Do dalszego różnicowania komórek, a także do ich fuzji wykorzystywana jest cytokina RANKL, która przez wiązanie się z receptorem RANK wyzwała kaskadę sygnałową wewnątrz dojrzewającego osteoklastu, która doprowadza do powstania w pełni funkcjonalnej komórki kościogubnej (43). Efektem ekspresji receptora RANK jest aktywacja czynników transkrypcyjnych: NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription Complex 1*), który wprowadza prekursorów osteoklastów na drogę osteoklastogenezy, NF κ B oraz cFos/Fra-1 (*Cellular Finkel-Biskis-Jenkins Marine Osteosarcoma*) (45, 56). Na metabolizm kości mają wpływ również hormony płciowe: androgeny i estrogeny.

Komórki prekursorowe osteoklastów powstają w szpiku kostnym z prekursorów szpikowych, które mogą również prowadzić do rozwoju makrofagów. Podobnie do makrofagów, prekursorów osteoklastów (*ang. Osteoclast Prekursor Cells –OCPs*) powodują ekspresję receptorów Fc γ . O ich udziale w odpowiedzi immunologicznej wiadomo od wielu lat, jednak ich powiązanie z makrofagami nie jest do końca udowodnione. Komórki prekursorowe osteoklastów krążą we krwi jak inne komórki hematopoetyczne. Ich liczba we krwi wzrasta wraz różnymi formami zapaleń, w trakcie których wzrasta produkcja TNF (56). **Resorpcja kości zachodzi pod wpływem wydzielanych przez osteoklasty jonów wodoru i katepsyny K. Jony wodoru doprowadzają do zakwaszania obszaru pod osteoklastami, powodując rozpuszczanie składników mineralnych macierzy kości, natomiast katepsyna K rozkłada elementy białkowe kości, głównie kolagen typu I.** (58, 59)

Komórki prekursorowe **osteoblastów** wywodzą się z komórek mezenchymalnych pnia. Oprócz osteoblastów wywodzą się z nich również chondrocyty, komórki mięśniowe i adipocyty (32). Komórki prekursorowe są pobudzane do przekształcania się w dojrzałe osteoblasty pod wpływem wielu czynników. Należą do nich: czynniki wzrostu, hormony oraz modulujące proliferację, różnicowanie i migrację komórek cytokiny (47). **Jedną z najważniejszych funkcji osteoblastów jest produkcja składników istoty międzykomórkowej kości, takich jak kolagen I typu i proteoglikany, które są odkładane w formie niezmineralizowanego osteoidu, wtórnie ulegającego mineralizacji.** Osteoblasty wydzielają białka, które biorą udział w precypitacji soli wapnia a także w tworzeniu kryształów hydroksyapatytów, osteonektyny i osteokalcyny (32, 41). Po uzyskaniu dojrzałości, osteoblasty ulegają apoptozie, zostają zatrzymane w macierzy kostnej jako osteocyty lub pozostają na powierzchni kości jako komórki wyściełające (44). Osteoblasty poza funkcją kościotwórczą mają istotną rolę w procesie resorpcji kości oraz pełnią funkcję kontrolną procesu osteoklastogenezy (60, 61) poprzez wytwarzanie RANKL i OPG (60). Proces resorpcji kości składa się z szeregu etapów, które prowadzą do usuwania składników organicznych, jak i mineralnych macierzy kostnej przez osteoklasty. W pierwszym etapie tego procesu dochodzi do rekrutacji prekursorów osteoklastów. Komórki prekursorowe osteoklastów dostają się na powierzchnię kości ze szpiku kostnego i śledziona drogą krwi krążącej (62). Kolejnym etapem jest przygotowanie powierzchni kości poprzez usunięcie niezmineralizowanej warstwy osteoidu przez proteolityczne enzymy, takie jak metaloproteinazy, kolagenazy i żelatynazy. Enzymy te wydzielane są przez wierzchołkowy rąbek szczoteczki (*ang. Ruffled Border*) (57, 62, 63). Jest to miejsce wydzielania enzymów specyficznych, które zakwaszają obszar resorbowanej kości. Pomiędzy rąbkiem

szczoteczkowym a powierzchnią kości występuje bogata w integryny tzw. strefa jasna (*ang. Saling Zone*). Dzięki niej w przestrzeni resorpcyjnej utrzymywane jest niskie pH (32, 57). Ułatwia to dostęp osteoklastów do głębszej zmineralizowanej warstwy kości. W następnym etapie dochodzi do rozpoznawania białek macierzy zewnątrzkomórkowej przez receptory adhezyjne nadrodziny integryn, zwłaszcza receptor witronektyny - $\alpha\beta3$. Receptor ten łączy się z zewnątrzkomórkowymi białkami macierzy kostnej, takimi jak osteopontyna, w miejscu trójpeptydowej sekwencji arginina-glicyna-kwas asparginowy (RGD), co ma kluczowe znaczenie w polaryzacji osteoklastów (62). W obrębie rąbka szczoteczkowego dochodzi do degradacji macierzy kostnej i resorpcji tkanki (57). Na resorpcję kości mają również wpływ takie czynniki jak prostaglandyny, cytokiny i chemokiny (*Tabela III i IV*).

Interleukina-1 α i β (IL-1 α , IL-1 β), interleukina-6 (IL-6), interleukina-11 (IL-11) oraz czynnik martwicy nowotworów $-\alpha$ i β (TNF- α i β) wykazują aktywność resorpcyjną. Wszystkie te cytokiny są zaliczane do grupy czynników aktywacji osteoklastów (*ang. Osteoclast – Activating Factor OAF*) (7, 48). Interleukina – 1 α jest bardzo silnym stymulatorem resorpcji kości. Wydzielana jest przede wszystkim przez monocyty i makrofagi, a także m.in. przez keratynocyty, chondrocyty i komórki Langerhansa (64). Efekt działania IL-1 α zależy od jej stężenia. Średnia i wysoka koncentracja IL-1 α stymuluje resorpcję kości działając bezpośrednio oraz pośrednio na osteoklasty zwiększając produkcję i aktywność RANKL oraz 1,25 – dihydroksywitaminę D3 (1, 65). Niskie stężenia IL-1 α stymulują proliferację osteoblastów i syntezę kolagenu. Interleukina – 1 α wpływa na podtrzymywanie procesów zapalnych poprzez stymulację komórek CD4+, chemotaksję neutrofilii oraz makrofagów w miejsce stanu zapalnego, a także zwiększa ekspresję molekuł adhezyjnych śródbłonna (1). Ponadto

stymuluje wydzielanie histaminy przez bazofile oraz produkcję prostaglandyn (65).

Interleukina – 6 jest multipotencjalną cytokiną produkowaną przez osteoblasty. W badaniach *in vitro* wykazano, że posiada ona zdolność wpływania na proces resorpcji kości. IL-6 kontroluje rozwój dojrzałych osteoklastów oraz bezpośrednio stymuluje produkcję RANKL, OPG i prostaglandyn (65).

Komórki kości produkują interleukinę – 11, która stymuluje formowanie osteoklastów i tym samym zwiększenie aktywności procesu niszczenia kości (65).

Produktem metabolizmu kwasu arachidonowego jest – prostaglandyna E₂ (PGE₂), która zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych w zapaleniach, wpływa na resorpcję kości w zmianach zapalnych (7, 48) i jest silnym aktywatorem osteoklastów (65).

Tabela III. Czynniki wpływające dodatnio na rozwój i aktywację osteoklastów (1, 7, 64, 65, 66)

Czynnik	Czynniki wpływające dodatnio na rozwój i aktywację osteoklastów
Mechanizm działania	
M-CSF	<ul style="list-style-type: none"> ➤ stymuluje ekspresję RANK na prekursorach osteoklastów, ➤ hamuje apoptozę osteoklastów.
RANKL	<ul style="list-style-type: none"> ➤ podstawowy aktywator osteoklastogenezy, ➤ hamuje apoptozę osteoklastów i zwiększa ich aktywność.
TNF	<ul style="list-style-type: none"> ➤ indukuje osteoklastogenezę, ➤ aktywuje osteoklasty, ➤ zwiększa stosunek RANKL/OPG, hamuje apoptozę.
IL1α	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pobudza tworzenie PGE2 i IL6, M-CSF, ➤ wpływa na resorpcję kości w sposób zależny i niezależny od RANKL i OPG, ➤ hamuje apoptozę osteoklastów, ➤ zwiększa stosunek RANKL/OPG.
IL6	<ul style="list-style-type: none"> ➤ w małych stężeniach aktywują osteoklastogenezę, w dużych stężeniach aktywują osteoklasty.
IL11	<ul style="list-style-type: none"> ➤ aktywuje osteoklastogenezę, ➤ zwiększa stosunek RANKL/OPG.
IL17	<ul style="list-style-type: none"> ➤ stymuluje limfocyty T do wytwarzania RANKL.
PGE2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ stymuluje syntezę RANKL w limfocytach B i osteoblastach ➤ stymuluje wytwarzanie IL6 w osteoblastach, ➤ hamuje w tworzenie OPG.
TGFβ	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pełni kluczową rolę w przekształcaniu monocytów w preosteoblasty.

Tabela IV. Czynniki wpływające ujemnie na rozwój i aktywację osteoklastów (1,7, 64, 65, 66)

Czynniki	Czynniki wpływające ujemnie na rozwój i aktywację osteoklastów
	Mechanizm działania
OPG	➤ receptor kompetycyjny dla RANKL
IL4	➤ działa jako inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF κ B, a także kinazy białkowej p38 MAPK ➤ obniża stosunek RANKL/OPG
IFNγ	➤ niszczy białko TRAF6, co doprowadza do zahamowania procesu osteoklastogenezy
TGFβ	➤ zwiększa syntezę OPG w osteoblastach

2.6 Charakterystyka molekularna zmian okołowierzchołkowych

2.6.1 Zakażenie bakteryjne. Lipopolisacharydy

Niektóre drobnoustroje w połączeniu z innymi bakteriami są zdolne wywołać proces zapalny okolicy przywierzchołkowej. *Enterococcus faecalis* wykazuje słabą zdolność do wywołania zapaleń okołowierzchołkowych, natomiast staje się silnym patogenem w połączeniu z *Streptococcus milleri* oraz *Anaplasma bovis* (7). Współzależności pomiędzy grupami bakterii mogą być zarówno dodatnie (synergistyczne) jak i ujemne (3, 7, 25). Drobnoustroje posiadają zdolność do unikania i zaburzenia odpowiedzi obronnej gospodarza. Uwalniane przez nie lipopolisacharydy (LPS) sygnalizują komórkom śródbłonna konieczność zwiększenia ekspresji molekuł adhezyjnych leukocytów, co prowadzi do wynaczyń w miejscu toczącego się procesu zapalnego. Bakterie Gram-ujemne uwalniają cząsteczki błonowe i rozpuszczalne antygeny, które dezaktywują przeciwciała gospodarza, czyniąc je niezdolnymi do działania (3, 7)

Lipopolisacharydy (LPS) nazywane „endotoksyną bakteryjną” są integralną częścią ściany komórkowej bakterii Gram ujemnych (3). Są one uwalniane do organizmu, gdy dochodzi do śmierci i rozpadu bakterii lub podczas ich podziału i wzrostu. Poza wpływem na komórki śródbłonna do pobudzania molekuł adhezyjnych leukocytów, funkcją LPS jest aktywacja makrofagów do produkcji mediatorów takich jak TNF (3), interleukiny (3, 7) oraz prostaglandyny E₂ (PGE₂) (7). Obecność LPS wykazano w kanałach korzeniowych oraz miazdze zębów (3). Bakterie Gram-ujemne bytujące w kanałach korzeniowych podczas rozmnażania się i śmierci uwalniają LPS, który przedostając się w okolice okołowierzchołkową (67)

inicjuje i podtrzymuje toczący się proces zapalny (68). Wykazano, że LPS wpływają na resorpcję kości (7).

Mikroorganizmy zakażające ząb uwalniają ponadto białka, węglowodany i lipidy, które posiadają zdolność do pobudzania komórek gospodarza do produkcji cytokin (69).

Bakterie znajdujące się w kanałach zębowych produkują kolagenazy, hialuronidazy, fibrynolizyny i niektóre proteazy, które ułatwiają drobnoustrojom rozprzestrzenianie się w organizmie gospodarza. Niektóre enzymy doprowadzają do niszczenia białek osocza krwi zaangażowanych w proces krzepnięcia krwi (3).

2.6.2 Odpowiedź gospodarza (Limfocyty T, B, granulocyty obojętne, leukotrieny, immunoglobuliny, prostaglandyny, metaloproteinazy)

Cechą charakterystyczną zapaleń okołowierzchołkowych zębów jest naciek zawierający limfocyty T i B, komórki plazmatyczne, granulocyty z segmentowanym jądrem (PMN), makrofagi, komórki plazmatyczne, komórki NK oraz eozynofile. Ponadto w skład nacieku zapalnego wchodzi również komórki niezapalne, takie jak: fibroblasty, komórki śródbłona naczyniowego, osteoblasty i osteoklasty(7). Wskazuje to, że w patogenezę zmian zębopochodnych zaangażowana jest komórkowa odpowiedź immunologiczna. Limfocyty T i B odgrywają główną rolę w tworzeniu zmian okołowierzchołkowych zębów. Limfocyty T na podstawie ich funkcji oraz efektu działania zostały podzielone na dwie grupy. Pierwsza z nich, wspomagająca działanie limfocytów B otrzymała nazwę limfocytów pomocniczych (T_h). Druga grupa wykazuje bezpośrednie działanie cytotoksyczne i supresorowe na inne komórki, nosi nazwę limfocytów

cytotoksycznych (T_c) lub supresorowych (T_s). Na powierzchni komórek T_h zidentyfikowano antygen CD4, natomiast na komórkach $T_{c/s}$ - CD8. Komórki T_h różnicują się w dwie subpopulacje T_{h1} uwalniające IL-2 i interferon (IFN) oraz T_{h2} wydzielające IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 oraz IL-13 (70, 71). T_{h1} odpowiadają za natężenie procesu fagocytozy komórek żernych, aktywację makrofagów i indukcję ekspresji cytokin prozapalnych. Wykazano, że komórki T_{h2} dominują w ziarniniakach okołowierzchołkowych, a wydzielane przez nie IL-4 i IL-10 biorą udział w zahamowaniu odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego (3, 5, 72, 73). Limfocyty B odpowiadają bezpośrednio za produkcję przeciwciał. Część komórek B na skutek kontaktu z antygenem, lub po otrzymaniu sygnału z komórek T_{h2} przeobraża się w komórki plazmatyczne (3).

Czynnikiem, który bierze udział zarówno w obronie organizmu, jak również w degradacji sąsiadujących tkanek są neutrofile. Nadmiar i wzrost aktywności neutrofili sprzyja procesowi zapalnemu (30). Gdy dochodzi do zakażenia neutrofile biorą udział w zarówno w procesach obronnych, jak również uwalniają prostaglandyny oraz leukotrieny. Te ostatnie przyciągają jeszcze więcej neutrofili, a także makrofagi, które z kolei mogą aktywować osteoklasty. Neutrofile ginąc w miejscu zapalenia uwalniają enzymy, które powodują degradację macierzy zewnątrzkomórkowej oraz komórek (3).

Leukotrieny (LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ oraz LTE₄) są syntetyzowane z kwasu arachidonowego na skutek działania lipooksygenazy. LTB₄, który został wykryty w zmianach okołowierzchołkowych, stanowi silny czynnik chemotaktyczny dla granulocytów obojętnochłonnych, a także powoduje adhezję PMN do ściany śródbłonka (3). W nacieku zapalnym granulocyty wielojądrzaste pośredniczą w niespecyficznej i specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Uważa się, że PMN są komórkami przede wszystkim obronnymi, jednak doprowadzają one do poważnych uszkodzeń tkanek

gospodarza. Pobudzone PMN uwalniają rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne, które doprowadzają do niszczenia strukturalnych elementów tkanek oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Ze względu na krótki okres życia, PMN główną rolę odgrywają w ostrej fazie zapalenia. (19, 30)

Dominującą immunoglobuliną w ziarniniakach przywierzchołkowych jest IgG. Około 74% komórek w zmianach okołowierzchołkowych produkuje IgG, 20% IgA, 4% IgE oraz 2% IgM. Obecność komórek zawierających IgE oraz komórek tucznych może świadczyć o tym, że w zapaleniach ziarninowych nadwrażliwość anafilaktyczna odgrywa również ważną rolę. Wymienione wcześniej mediatory zapaleń (cytokiny, prostaglandyny, kininy oraz neuropeptydy) uczestniczą w obronie organizmu oraz przyczyniają się również do niszczenia otaczającej kości.

Prostaglandyny, produkty metabolizmu kwasu arachidonowego (PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂). PGE₂ i PGI₂ są silnymi aktywatorami osteoklastów. PGE₂ ma znaczenie w zapaleniach tkanek okołowierzchołkowych o ostrym przebiegu. Zmiany zapalne z przewagą komórek PMN, stanowią istotne źródło prostaglandyny E₂ (7, 65). PGE₂ zwiększa przede wszystkim przepuszczalność naczyń krwionośnych w stanach zapalnych (7).

Istotną rolę w niszczeniu kości w procesach zapalnych pełnią metaloproteinazy (MMP), czyli proteazy posiadające zdolność do degradacji niemal wszystkich komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej (*ang. ECM – Extracellular Matrix*) i błony podstawnej (27, 30). Dotychczas wykryto 28 rodzajów MMPs, w tym 23 u człowieka. Enzymy te są produkowane przez większość komórek (komórki nabłonka, fibroblasty, keratynocyty, komórki endotelium, osteoblasty, makrofagi i komórki nacieku zapalnego: monocyty, limfocyty jednojądrzaste, leukocyty. (30) Wykazano, że kolagenazy (MMP1,

MMP8, MMP13, MMP18) – niszczą kolagen typu I, II, III, VI, X; żelatynaza (MMP2, MMP9) – degradowuje kolagen typu IV, V, VII, IX, fibronektynę i elastynę, działają synergistycznie z kolagenazami; stromielizyny – rozkładające fibronektynę i kolagen (MMP3, MMP10, MMP11); matrylizyny – rozkładające kolagen typu IV, fibronektynę i fibrynogen (MMP7, MMP12, MMP26,); metaloproteinazy typu błonowego (*Membrane Type MMP, MT-MMPs*) – aktywują inne metaloproteinazy (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, MMP25) oraz (MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP22, MMP23, MMP27, MMP28) (27). W procesach zapalnych tkanek okołowierzchołkowych znaczenie mają MMP1, MMP2 oraz MMP3, gdyż uczestniczą w procesie resorpcji tkanki kostnej.(27, 30, 74) Ich działanie sprowadza się do niszczenia niezmineralizowanych elementów osteoidu i tym samym odsłonięciu części zmineralizowanej na działanie osteoklastów (27). W trakcie powstawania i wzrostu torbieli zębopochodnych, metaloproteinazy rozpoczynają degradację kości. Degradacja przez mikroorganizmy, ich toksyny i czynnik zapalny, indukowana jest dwojako: przez produkty bakteryjne (endotoksyny, enzymy, lipopolisacharyd) stymulujące komórki do tworzenia i wydzielania metaloprotein, oraz poprzez produkty bakteryjne zdolne do wywołania odpowiedzi immunologicznej makrofagów i innych komórek nacieku zapalnego. W przebiegu tego procesu uruchamiają się kaskady cytokin zapalnych, takich jak $TNF\alpha$, $TGF\beta$, IL-1, IL-6. Cytokiny te pobudzają produkcję MMPs na drodze autokrynej lub parakrynej. Pobudzają MMPs również do produkcji keratynocytów, fibroblastów, komórek nabłonka i osteoblastów (27).

2.6.3 Szlak RANKL/RANK/OPG

2.6.3.1 Osteoprotegeryna (OPG)

Osteoprotegeryna została odkryta w 1997 roku równocześnie przez trzy niezależne laboratoria pracujące nad odmiennymi projektami (32, 50, 57, 75). OPG jest powszechnie występującym w organizmie człowieka rozpuszczalnym receptorem białkowym należącym do nadrodziny receptorów czynników martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor - TNFR*) (32, 59, 75, 76, 77). W przeciwieństwie do pozostałych członków rodziny TNF, nie posiada przezbłonowej i cytoplazmatycznej domeny, przez co jest wydzielana przez **komórki podścieliska i osteoblasty** w postaci rozpuszczalnej (42, 75, 78). Nazwę swą (łac. os – kość i protegere – chronić) otrzymało po doświadczeniu, które wykazało jej zdolność do powstrzymania procesu tworzenia osteoklastów przy obecności silnych stymulatorów resorpcji, takich jak 1,25(OH)2D3, PTH, PGE2 oraz IL-11 (32, 50). Inną nazwą dla osteoprotegeryny jest **czynnik hamujący osteoklastogenezę** (ang. *Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF*) (79).

OPG jest glikoproteina kodowaną w chromosomie 8q24, o masie cząsteczkowej 55kDa, syntetyzowaną jako białko prekursorowe zawierające 401 aminokwasów (łącznie z 21-aminokwasową sekwencją sygnałową) (42, 77, 80). W skutek rozerwania 21 wiązań jest przetwarzana w postać dojrzałą zawierającą 380 aminokwasów (42, 77). Aktywność biologiczna OPG jest swoiście determinowana przez 3 strukturalne domeny. Od strony N-końca wyróżnia się 4 domeny bogate w cysteinę, które wiążąc RANKL hamują syntezę osteoklastów oraz odpowiadają, poprzez cysteinę w pozycji 400 (Cys⁴⁰⁰), za dimeryzację OPG. W dalszej części znajdują się dwie domeny homologiczne do domen śmierci (DDH; ang. *Death Domain Homologous Regions*), uczestniczą one w transdukcji

sygnału apoptozy (80). Ostatnia jest domena wiążąca heparynę, wykazuje ona zdolność do interakcji z proteoglikanami (80).

Transkrypty mRNA dla OPG stwierdzono w **osteoblastach i komórkach podścieliska szpiku kostnego, a także w komórkach limfoidalnych, śródbłonka, limfocytach T i B oraz megakariocytach**. Wytwarzana jest w nerkach, wątrobie i tarczycy oraz w wielu tkankach płodowych (76, 80). Pomimo iż OPG produkowana jest głównie przez osteoblasty, nie jest ściśle związana z tkanką kostną, występuje również w aorcie i dużych tętnicach (50, 81). **OPG jest receptorem kompetycyjnym (ang. *Decoy Receptor*) dla RANKL**, stanowi dla niego swoisty „receptor – pułapkę (atrapę)” (50, 80). **Łącząc się z nim blokuje jego połączenie z RANK, tym samym zapobiega jego aktywacji na powierzchni osteoklasta i wystąpieniu resorpcji kości (50, 76) poprzez modulację syntezy osteoklastów (80)**. U myszy, u których stwierdzono nadmierną aktywność OPG, zauważono znacznie zmniejszoną liczbę osteoklastów i rozwój **osteopetrozy**. U myszy u których inaktywowano OPG, rozwinęła się **osteoporoza**. Myszy pozbawione genu osteoprotegeryny, umierały z powodu zaburzeń szkieletowych i nadmiernej kalcyfikacji naczyń. Połączenie osteoprotegeryny z RANKL skutkuje zahamowaniem końcowych stadiów osteoklastogenezy, a także proliferacji, różnicowania, przetrwania oraz fuzji komórek prekursorowych osteoklastów. Ponadto hamuje aktywność osteoklastów i promowanie apoptozy osteoklastów *in vitro* (75, 76). **Podstawową rolą OPG w organizmie jest ochrona kości przed resorpcją**. Jednakże badania dowodzą, że dodatkową funkcją tego białka jest ochrona przed kalcyfikacją naczyń (32). Na poziom ekspresji genu OPG ma wpływ wiele czynników. Jego ekspresję zwiększają: cytokiny (TNF α , IL-1 α , IL-18, TNF- β), białka morfotyczne kości, 17 β -estradiol, obciążenia mechaniczne kości. Na zmniejszenie ekspresji

wpływają: leki (glikokortykosteroidy, leki immunonupresyjne), PTH, prostaglandyna E2, FGF (*ang. Fibroblast Growth Factor*) (59, 81).

2.6.3.2 Ligand Receptora Aktywującego Jądrowy Czynn timer NF_κB – RANKL

RANKL (*ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF_κB Ligand*) (znany również jako TRANCE, OPGL, ODF) (74) został odkryty w 1998 roku podczas poszukiwań spokrewnionego z OPG liganda (50). Jest to białko kodowane przez pojedynczy gen w chromosomie 13q14 (80) należące do nadrodziny białek czynników martwicy nowotworów (TNF - *ang. Tumor Necrosis Factor*). U człowieka występują trzy izoformy RANKL. RANKL1 i RANKL2 są glikoproteinami typu II związanymi z powierzchnią błony komórkowej. RANKL2 nie posiada wewnątrzkomórkowej domeny. RANKL1 zbudowany jest z 317 aminokwasów, natomiast RANKL2 z 270 aminokwasów. Te postaci mogą tworzyć na powierzchni błony komórkowej kompleksy, najczęściej trimery. Trzecią formą jest nieposiadający wewnątrzkomórkowej domeny, składający się z 217 aminokwasów RANKL3. Ta forma jest pierwotną rozpuszczalną postacią RANK (sRANKL; *ang. Soluble RANKL*) (42, 75, 80). RANKL3 jest monomerem. Masa cząsteczkowa postaci związanej z powierzchnią błony komórkowej wynosi około 40-45 kDa z kolei masa cząsteczkowa sRANKL wynosi 31 kDa (42). Podczas gdy sRANKL wytwarzane jest tylko przez aktywowane limfocyty T oraz nieliczne komórki nowotworowe, formy związane z błoną komórkową występują w różnych typach komórek, takich jak aktywowane limfocyty T (CD4⁺ i CD8⁺), podwójnie ujemne tymocyty, niedojrzałe limfocyty B, osteoblasty, osteoklasty, komórki podścieliska szpiku kostnego, fibroblasty, komórki

nabłonkowe, śródbłonek naczyniowy (80, 82). Do silnej ekspresji RANKL dochodzi w węzłach chłonnych, grasicy i płucach, niższy poziom ekspresji zauważono w śledzionie i szpiku kostnym. Ekspresję mRNA dla RANKL wykazano również w keratynocytach skóry, gruczołach sutkowych, komórkach nabłonkowych, sercu, mięśniach szkieletowych, żołądku, gruczole tarczowej oraz mózgu (42). Na poziom ekspresji RANKL wpływ mają cytokiny (IL-1 α , IL-6, IL-11, TNF- α) i glikokortykosteroidy oraz liczne komórki kostne i pozakostne, takie jak komórki podścieliska, osteoblasty, osteoklasty, komórki mezenchymalne okostnej, chondrocyty i komórki śródbłonka (75). Obie formy kontrolują różnicowanie osteoklastów działając poprzez specyficzny receptor RANK znajdujący się na powierzchni komórek prekursorowych osteoklastów. Większy wpływ na osteoklastogenezę wykazuje forma związana z błoną komórkową (42, 59).

RANKL jest czynnikiem, który wraz z M-CSF aktywuje cały proces tworzenia dojrzałych osteoklastów, czyli różnicowanie oraz przeżywanie komórek resorpcyjnych (hamuje apoptozę osteoklastów).

RANKL ponadto stymuluje uwalnianie niedojrzałych prekursorów osteoklastów do obrotu (57). Działanie osteotropowe to nie jedyna funkcja RANKL. Pełni również funkcje immunomodulacyjne. Kontroluje organogenezę węzłów chłonnych, rozwój tymocytów, moduluje aktywację limfocytów T (80, 83, 84). Jest czynnikiem przyżyciowym monocytów. Zwiększając ekspresję RANK na ich powierzchniach, moduluje poprzez indukcję i wydzielanie chemokin (80, 85). Zwiększając ekspresję cząsteczek kostymulujących aktywuje prezentację antygeny. RANKL odgrywa dużą rolę w komórkach dendrytycznych. Zwiększając ekspresję Bcl-xL chroni je przed apoptozą. Wzmaga ich właściwości immunostymulujące poprzez indukcję cytokin, a także razem z GM-CSF bierze udział w ich dojrzewaniu i różnicowaniu z komórek prekursorowych

wspólnych dla monocytów/makrofagów (80, 86, 87, 88). Udowodniono ponadto chemotaktyczną aktywność RANKL (80, 89).

2.6.3.3 Receptor Aktywujący Jądrowy Czynn timer- κ B - RANK

Receptor Aktywujący Jądrowy Czynn timer κ B – RANK (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor $NF_{\kappa}B$*), zwany również TRANCE-R (ang. TRANCE Receptor) i ODAR (receptor różnicowania i aktywacji osteoklastów; ang. *Osteoclast Differentiation and Activation Factor*) (66), należy do rodziny receptorów TNF i jest receptorem dla RANKL. RANK jest proteiną typu I, u człowieka kodowana jest w chromosomie 18q22.1 (79). RANK zbudowany jest z 616 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 90 kDA (66, 75, 77, 90, 91). RANK składa się z 3 domen: zewnątrzkomórkowej domeny N - końcowej, śródbłonkowego fragmentu składającego się z 21 aminokwasów, oraz domeny cytoplazmatycznej C – końcowej. W skład RANK wchodzi również zbudowana z 28 aminokwasów sekwencja sygnałowa (77, 90). W tkankach występuje jako trimer. Za wiązanie RANKL odpowiadają 4 bogate w cysteinę domeny występujące w zewnątrzkomórkowym fragmencie receptora. Zewnątrzkomórkowa domena wykazuje homologię z CD40 (55, 59, 80, 90). Podstawowymi komórkami w których dochodzi do ekspresji RANK są komórki linii monocytarno – makrofagowej, limfocyty T i B, proteosteoklasty i osteoblasty, komórki dendrytyczne, fibroblasty, chondrocyty i komórki śródbłonka naczyniowego. Ponadto stwierdzono obecność tego receptora w szpiku kostnym, kościach, mózgu, wątrobie, sercu, nerkach, płucach, tkankach sutka, mięśniach szkieletowych i skórze (55, 59, 66, 80). Na zwiększenie ekspresji RANK wpływają: RANKL, IL-1 α , onkostatyna M (OSM; Oncostatin M), IFN- γ , witamina D3, białko zapalne makrofagów – MIP, naczyniowy polipeptyd jelitowy – VIP.

Zmniejszenie ekspresji RANK następuje pod wpływem: IGF – 1, IL-4, FGF -2 (66, 80, 85, 92, 93)

2.6.3.4 Kaskada sygnałów RANK-RANKL

RANKL wiąże się ze swoim receptorem RANK na powierzchni osteoklastów, co prowadzi do uruchomienia kaskady sygnałów, która aktywuje swoiste geny opowiadające za przeżycie i różnicowanie osteoklastów, a także za resorpcję kości (42, 80). RANKL, który występuje w postaci trimerów reaguje z trzema cząsteczkami RANK. Powstanie trimery RANK wywołuje zmiany konformacyjne w domenie cytoplazmatycznej receptora i uruchamia kaskadę przekazu sygnału do wnętrza komórki (cyt. 80). RANK nie posiada żadnych aktywności kinazy. Po związaniu się z ligandem, aby doszło do transdukcji sygnału, musi angażować specyficzne czynniki (42). Głównym pośrednikiem sygnału jest białko adaptorowe TRAF (TNF Receptor – Associated Factors) (52). RANK koduje cytoplazmatyczną domenę zawierającą kilka miejsc wiązania TRAF, które gromadzą się w różnych domenach: regiony obejmujące aminokwasy 235 – 258 oraz 359 – 531 wiążą TRAF 6, region aminokwasów 532 – 625 zawiera miejsca wiązania dla TRAF 2, 5 i 6, prowadzi to do powstania trimery TRAF oraz aktywacji kilku dróg przekazywania sygnału (42, 80). Te domeny wiążące TRAF pośredniczą w indukowanej przez RANK aktywacji $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i N-końcowej kinazy c-Jun (JNK) (42, 52, 94, 95). Receptory wiążące białko TRAF podzielone są na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą receptory posiadające cytoplazmatyczne domeny śmierci: Fas, TNFR1, DR4, DR5, DR6, poprzez które w sposób pośredni, za pośrednictwem białek adaptorowych TRADD i FADD, wiążą białka TRAF. Druga grupa, nie posiada domen śmierci i

bezpośrednio wiąże TRAF, zaliczają się do niej: RANK, TNFR2, CD40 oraz CD30. Cytoplazmatyczne domeny RANK zawierają miejsca wiążące dla TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 oraz TRAF6, z pośród których TRAF2 i TRAF6 mają największe znaczenie w transdukcji sygnału (80, 91). Białka TRAF2, 5 oraz 6 biorą udział w aktywacji jądrowego czynnika κ B (88, 91, 96). Jednak główną rolę w transdukcji sygnału RANK pełni TRAF6. Wykazano, że brak tego białka prowadzi do **osteopetrozy** (52, 96, 97). TRAF2 razem z kinazą ASK1 (*ang. Apoptosis Signal – Regulating Kinase -1*) bierze udział w aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP1 (*ang. Activator Protein*), który pełni znaczącą rolę w różnicowaniu osteoklastów (80, 97). TRAF6 może aktywować procesy różnicowania, aktywacji i ochrony osteoklastów przed apoptozą poprzez aktywację kilku szlaków transdukcji sygnału. Pierwszy szlak prowadzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF κ B. Dochodzi do tego poprzez aktywację kinazy serynowo – treoninowej TAK1 oraz białka TAB2 (*TAK1 Binding Protein 2*), następnie kinazy NIK (*NF κ B – Inducing Kinase*) i kinaz IKK (*I κ B Kinases*) (52, 80). Drugą drogę stanowi aktywacja kinaz ze szlaku MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), czyli: JNK (*Jun N-terminal Kinase*), p38 i ERK (*extracellular – Signac regulated kinase*), oraz czynnika transkrypcyjnego AP1. Ponadto w skutek aktywacji należącej do MAPK kinazy białkowej p38, dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego MITF (*ang. Microphthalmia Transcription Factor*), który jest niezbędny do końcowego różnicowania osteoklastów (52, 80). Trzecia droga przekazywania sygnału polega na tworzeniu przez TRAF6 z białkiem c-SRC i c-Cbl kompleksu aktywującego kinazę – 3 fosfatydyloinozytolu (PI-3K), a następnie kinazę Akt, która poprzez białko mTOR (białko wiążące kompleks rapamycyna/receptor) pośredniczy w przekazywaniu sygnału antyapoptotycznego i reorganizację cytoszkieletu (52, 80, 97).

2.7 Leczenie zmian okołowierzchołkowych

Leczenie zmian okołowierzchołkowych o charakterze torbieli zębopochodnych polega na ich chirurgicznym wyłuszczeniu. Obecnie metodą z wyboru jest cystektomia (metoda Partsch II), czyli zabieg chirurgiczny mający na celu jednoczesowe, całkowite usunięcie patologicznej zmiany. Rana pooperacyjna goi się poprzez wypełnienie ubytku kostnego skrzepem, który ulega organizacji łącznotkankowej i skostnieniu (103). Drugą, rzadziej stosowaną metodą jest zabieg wgłobienia torbieli (cystotomia, metoda Partsch I). Zabieg ten, zarezerwowany dla dużych torbieli, polega na wycięciu części ściany torbieli, a następnie wgłobieniu płata śluzówkowo – okostnowego do wnętrza jamy i utrzymywaniu go szwami brzeżnymi i setonem nasączonym antyseptykami. Aby zapobiec zarośnięciu jamy torbieli należy wykonać odpowiedni otwór w kości i utrzymywać go za pomocą akrylowego obturatora. W drugim etapie, gdy kość odbuduje się zmniejszając jamę torbieli, wyłuszcza się pozostałą część worka i ranę pokrywa się zszytą śluzówką (103). Usuniętą ścianę torbieli zawsze należy przesłać do badania histopatologicznego (22, 103).

3. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie poziomu ekspresji liganda receptora aktywatora czynnika jądrowego NF- κ B i jego inhibitora osteoprotegeryny oraz interleukiny-1 w stanach zapalnych tkanek okołowierzchołkowych w obrębie szczęki i żuchwy w porównaniu do grupy kontrolnej. Dalszym celem było wykazanie jaki jest wpływ szlaku RANKL/RANK/OPG oraz IL-1 na powstawanie ubytków w kościach żuchwy i szczęki.

4. Materiał i metody

4.1 Pacjenci i materiał do badań

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (Reg. nr NKEBN/375/2009). Przed rozpoczęciem leczenia szczegółowo poinformowano chorych o rodzaju badań. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie pobranego materiału pooperacyjnego do przeprowadzenia badań histologicznych oraz molekularnych. Materiał do badań pobrano od 40 pacjentów (28 mężczyzn i 12 kobiet) w wieku od 17 do 89 lat (średnia wieku 49,7 lat), u których na podstawie oceny zdjęć rentgenowskich lub TK (ubytek kostny prezentował się najczęściej w postaci przejaśnienia w okolicy okołowierzchołkowej zęba), postawiono wstępne rozpoznanie ziarniniaka okołowierzchołkowego lub torbieli zębopochodnej. Podczas zabiegów wykonywanych w Poradni Chirurgii Stomatologicznej GUMed w warunkach ambulatoryjnych w znieczuleniu miejscowym uzyskano następujące typy zmian: ziarniniaki okołowierzchołkowe (n = 16), torbiele zapalne (n = 18) oraz torbiele zawiązkowe (n = 5), natomiast podczas operacji przeprowadzonych w Klinice Chirurgii Szcękowo – Twarzowej i Stomatologicznej GUMed pobrano torbiel zapalną (n=1) podczas zabiegu w znieczuleniu ogólnym. Łącznie pobrano 40 zmian patologicznych kości szczęk i żuchwy. Próbkę podzielono na dwie części. Jedną z nich została utrwalona w 10% roztworze formaliny i przekazana do Zakładu Patomorfologii GUMed w celu ostatecznego określenia charakteru zmiany oraz przeprowadzenia badań immunohistochemicznych. Drugi fragment natychmiast umieszczono w plastikowym pojemniku, zamrożono w ciekłym azocie i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C do czasu wykonania badań molekularnych.

Badania histopatologiczne oraz immunohistochemiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii GUMed (kierownik: prof. dr hab. Wojciech Biernat), natomiast badania molekularne wykonano w Zakładzie Medycyny Molekularnej GUMed (kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk)

4.2 Metodyka badań molekularnych

4.2.1 Bufory i odczynniki

Do przeprowadzenia badań molekularnych użyto następujących buforów i odczynników: **A. Bufor obciążający (BOB) 4 x stężony (40ml)**

(1,25ml 1M TRIS-HCL, pH 6,8; 4ml 20% SDS; 460mg DTT; 4ml gliceryny; 1,5mg bromophenol blue); **B. Bufor SDS – PAGE**

(25mM Tris; 250mM glicyna; 0,1% SDS; H₂O do końcowej objętości); **C.**

Bufor TBS pH 7,4 (10 x stężony – 1000 ml) (30g TRIS; 80g NaCl; 2g KCl; H₂O do 1000ml); **D. BCIP** (0,5g 5-bromo-4 chloro-3indolyl

phosphatase rozpuszczono w 10ml 100% dimetyloformamidu); **E. NBT**

(0,5g NBT (błękit tetrazoliowy) rozpuszczono w 10 ml 70% dimetyloformamidu)

4.2.2 Pomiar stężenia białka

W celu oznaczenia stężenia białka w homogenacie tkankowym posługiwano się metodą Lowry'ego. (98)

4.2.3 Przygotowanie ekstraktów białkowych

Odpowiednie tkanki rozdrobniono wstępnie skalpelem i homogenizowano w szklano – teflonowym homogenizatorze w trzech objętościach schłodzonego buforu (50 mmol/L Tris/HCl, pH 7.2; 5 mmol/L EDTA; 100 mmol/L NaCl; 1% Triton X-100; 10% glycerol; 10 mmol/L KH₂PO₄ ; 1

mmol/L Pefabloc SC; 5 µg/mL leupeptyny), a następnie inkubowano w lodzie przez 15 min.

Otrzymany homogenat wirowano przy 10000 x g przez 15 min w 4°C. Supernatant jako ekstrakt białkowy zbierano do nowych probówek i przechowywano w -20°C do analizy Western Blot.

4.2.4 Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

Wykonano rozdział (100µg) badanego lizatu białkowego na 10% żelu poliakrylamidowym z 3% żelem zagęszczającym o grubości 0,75mm. Badaną próbkę zamieszczono w buforze TRIS-HCl wraz z buforem obciążającym (Met. 4.2.1A) przed nałożeniem na żel poddawano 5 minutowej denaturacji w temperaturze 98°C. Elektroforeza była prowadzona w buforze SDS-PAGE (Met. 4.2.1B). Po rozdziale elektroforetycznym przeprowadzono transfer białek z żelu poliakrylamidowego na błonę poliwinylową metodą transferu suchego przy użyciu aparatu iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). Następnie błonę przecinano względem wzorca masowego białka na odpowiedniej wysokości i blokowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej w 3% roztworze albuminy wołowej (BSA, V frakcja) zawierającej 0,02% azydek sodu. Błonę przenoszono do świeżego roztworu zawierającego przeciwciała przeciwko białku OPG (R&D) w rozcieńczeniu 1:500 oraz przeciwko białku RANKL (R&D) w rozcieńczeniu 1:500 i przeciwko białku IL-1α (Santa Cruz Biotechnology) w rozcieńczeniu 1:500, bądź przeciwciała dla białka p14-3-3 (Santa Cruz Biotechnology) w rozcieńczeniu 1:1000 i inkubowano w temperaturze 4°C przez noc. Po zakończeniu inkubacji błonę trzykrotnie przepłukano 200ml buforu TBS. Potem umieszczono w 3% roztworze albuminy z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą w

rozcieńczeniu 1:10000 i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Błoneę przepłukano w 200ml TBS (Met. 4.2.1C) w celu przeprowadzenia reakcji fosfatazy alkalicznej z substratem BCIP/NBT (Met. 4.2.1D i 4.2.1E), błoneę przenoszono do 100mM buforu TRIS-HCl, pH 9,5 zawierającego 5mM MgCl₂ oraz BCIP/NBT. Zazwyczaj reakcję przeprowadzano przez 30 min. w temperaturze pokojowej i po ukazaniu się wyraźnych prążków reakcję zatrzymywano przez dodanie 20mM EDTA w buforze TBS. Otrzymane prążki analizowano densytometrycznie za pomocą systemu Gel Doc 2000 firmy Bio-Rad. Jako białko referencyjne używano białko p14-3-3. Względny poziom białek OPG, RANKL i IL-1 α wyrażano jako stosunek intensywność prążka odpowiadającego badanemu białku do intensywności prążka odpowiadającego białku referencyjnemu (14-3-3). Intensywność prążka program komputerowy podawał w arbitralnych jednostkach, po odjęciu intensywności tła (*Rycina 4*).

4.3 Badania histopatologiczne oraz immunohistochemiczne

4.3.1 Metoda badań immunohistochemicznych

Do badań wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w roztworze formaliny i zatopiony w niskotopliwej parafinie. Bloczki parafinowe krojono na mikrotomie saneczkowym na skrawki grubości 4 μ m, które nanoszono na silanizowane szkiełka podstawowe. Badania immunohistochemiczne wykonano na utrwalonym materiale tkankowym pochodzącym od 36 chorych. Po odparafinizowaniu skrawki poddano procedurze odmaskowania w łaźni wodnej, umieszczając je w buforze cytrynianowym (pH 6) i podgrzewając do temperatury 99°C przez 40 min. Endogenną peroksydazę blokowano inkubując skrawki w 3% roztworze H₂O₂ przez 10 min. w temperaturze pokojowej.

4.3.2 Pierwotne przeciwciała

- 1) Monoclonal Anti-human TRANCE/TNFSF 11 nr kat. MAB626, firma R&D Systems, przeciwciała rozcieńczone 1:100 – inkubacja nocna w temperaturze 4°C, system do wizualizacji LSAB + system HRP (Dako K0690) przez 30 min.
- 2) Anti-human Osteoprotegerin/TNFRSF11B Antibody nr kat: AF805, firma R&D Systems, przeciwciała rozcieńczone 1:50 – inkubacja nocna w temperaturze 4°C, system do wizualizacji LSAB + system HRP (Dako nr kat. K0690) przez 30 min.

Reakcję barwy uzyskano inkubując skrawki z roztworem czterochlorowodzianu 3,3 dwuaminobenzydyny (DAB) przez około 10 min. w temperaturze pokojowej. Następnie skrawki podbarwiono hematoksyliną Meyera i zamykano w balsamie kanadyjskim. Między poszczególnymi etapami procedury skrawki płukano w PBS'ie.

4.4 Analiza statystyczna.

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano program Statistica 9.0 PL (StatSoft, Polska). Normalność rozkładu badanych zmiennych cechy sprawdzano posługując się testem W Shapiro-Wilka. Do oceny istotności różnic pomiędzy uzyskanymi wynikami w dwóch grupach (kontrolnej i badanej) zastosowano test U Manna-Whitneya, natomiast do analizy wyników trzech grup próbek w grupie badanej zastosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Współczynnik R Spearmana użyto do analizy korelacji pomiędzy poziomem ekspresji analizowanych białek a danymi klinicznymi. Poziom istotności $p < 0,05$ uznawany był za znamienne statystycznie.

5. Wyniki badań

5.1 Materiał tkankowy

Materiał tkankowy od chorych został poddany badaniu histopatologicznemu. W wyniku tych badań rozpoznano: torbiele korzeniowe u 19 (47,50%), ziarniniaki okołowierzchołkowe u 16 (40%) i torbiele zawiązkowe u 5 (12,5%) chorych. Zmiany okołowierzchołkowe występowały głównie w grupie mężczyzn w wieku od 30 do 59 roku życia (*Tabela V i VI*). Najczęstszą lokalizacją ziarniniaka była kość żuchwy (56,25%), torbieli korzeniowej - szczęka (63,15%), torbieli zawiązkowej żuchwa w okolicy zębów ósmych (80%) (*Tabela VII*).

Tabela V. Rodzaj zmian okołowierzchołkowych a płeć chorych

Płeć	Charakter zmiany			Razem
	Ziarniniak	Torbiel zapalna	Torbiel zawiązkowa	
Mężczyźni	11 (27,5%)	14 (35,5%)	3 (7,5%)	28 (70%)
Kobiety	5 (12,5%)	5 (12,5%)	2 (5%)	12 (30%)
Razem	16 (40%)	19 (47,5%)	5 (12,5%)	40

Tabela VI. Rodzaj zmian okołowierzchołkowych a wiek chorych

Wiek	Charakter zmiany			Razem
	Ziarniniak	Torbiel korzeniowa	Torbiel związkowa	
10 – 29 r.ż.	4 (10%)	1 (2,5)	4 (10%)	9 (22,5%)
30 – 59 r.ż.	10 (25%)	11 (27,5%)	1 (2,5%)	22 (55%)
60 – 90 r.ż.	2 (5%)	7 (17,5%)	0 (0%)	9 (22,5%)
Razem	16 (40%)	19 (47,5%)	5 (12,5%)	40

Tabela VII. Częstość występowania zmian okołowierzchołkowych w kościach szczęki i żuchwy

Obszar kostny	Charakter zmiany			Razem
	Ziarniniak	Torbiel zapalna	Torbiel związkowa	
Szczęka	7	12	1	20
Żuchwa	9	7	4	20
Razem	16	19	5	40

Badania makroskopowe wykazały, że 37,5% zmian osiągnęła rozmiary od 0,3 do 0,8 cm; 57,5% zmian od 0,9 do 3cm; 5% zmian przekroczyło wielkość 3cm. (Tabela VIII).

Tabela VIII. Wielkość zmian okołowierzchołkowych szczęki i żuchwy

Średnica zmiany	Charakter zmiany			Razem
	Ziarniniak	Torbiel korzeniowa	Torbiel zawiązkowa	
0,3 – 0,8 cm	8 (20%)	7 (17,5%)	0 (0%)	15 (37,5%)
0,9 – 3 cm	8 (20%)	10 (25%)	5 (12,5%)	23 (57,5%)
>3 cm	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	2 (5%)
Razem	16 (40%)	19 (47,5%)	5 (12,5%)	40

5.2 Wyniki badań podmiotowych i przedmiotowych

Spośród chorych zakwalifikowanych do badania 14 (35%) zgłosiło się do Poradni Chirurgii Stomatologicznej GUMed z powodu dolegliwości bólowych zęba lub wyrostka zębodołowego w okolicy zmiany okołowierzchołkowej. 21 (52,5%) chorych deklarowało dobry stan zdrowia oraz nieprzyjmowanie żadnych leków na stałe. 19 (47,5%) badanych podało przynajmniej jedną przewlekłą chorobę ogólnoustrojową. 4 pacjentów chorowało na cukrzycę, 10 - nadciśnienie tętnicze, 1 osoba przyjmowała leki z powodu nadczynności tarczycy. 10 osób przyjmowało antybiotyki w okresie do 2 tygodni przed zabiegiem wyłuszczenia zmiany. Żaden pacjent nie uskarżał się na zaburzenia czucia w okolicy stanu zapalnego.

W badaniu fizykalnym u 17 (42,5%) badanych stwierdzono stan zapalny błony śluzowej w okolicy zmiany chorobowej. U 1 pacjenta wystąpiła deformacja kości wyrostka zębodołowego szczęki i zaburzenie symetrii twarzy z powodu rozrostu torbieli korzeniowej. Objawu Dupuytrena nie stwierdzono u żadnego z badanych. U 8 pacjentów na podstawie zdjęcia rentgenowskiego stwierdzono wcześniejsze leczenie endodontyczne zęba przyczynowego.

5.3 Wyniki badań immunohistochemicznych

Materiał tkankowy (n = 36) pobrany od pacjentów, który poddano badaniu immunohistochemicznemu stanowiły: ziarniniaki okołowierzchołkowe (n=14), torbiele korzeniowe (n=17) oraz torbiele zawiązkowe (n=5). Poziom ekspresji RANKL i OPG oceniano w odniesieniu do ilości immunoreaktywnych komórek w zmianie chorobowej. Poziom ekspresji białek RANKL i OPG oznaczano jako „0” dla braku ekspresji (<5% komórek pozytywnych), (+) dla słabej ekspresji (5% – 25% komórek z silną ekspresją), (++) dla średniej ekspresji (25% - 50% komórek z silną ekspresją) oraz (+++) dla silnej ekspresji (>50% komórek z silną ekspresją). RANKL i OPG uwidaczniało się przede wszystkim w cytoplazmie komórek.

Obecność RANKL wykazano we wszystkich badanych zmianach okołowierzchołkowych (ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych), niemal we wszystkich subpopulacjach komórek. Silną ekspresję białka RANKL wykazano w 11 (30%) torbielach zapalnych, 8 (22%) ziarniniakach okołowierzchołkowych i 4 (11%) torbielach zawiązkowych, średnią w 6 (17%) ziarniniakach i w 6 (17%) torbielach korzeniowych oraz w 1 (3%) torbieli zawiązkowej (*Tabela IX*). Najwięcej komórek z wysokim poziomem ekspresji liganda receptora RANK odnotowano w zmianach okołowierzchołkowych o średnicy 0,9 – 3cm (n=12) oraz 0,3 – 0,8 cm (n=9) (*Tabela X*).

Tabela IX. Ekspresja RANKL w zmianach okołowierzchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.

Poziom ekspresji RANKL

Charakter zmiany	Brak	Niski	Średni	Wysoki	Razem
	(0)	(+)	(++)	(+++)	
Ziarniniak okołowierzchołkowy	0	0	6	8	14
Torbiel korzeniowa	0	0	6	11	17
Torbiel zawiązkowa	0	0	1	4	5
Razem	0	0	13	23	36

Tabela X. Ekspresja RANKL a rozmiar zmian okołowierzchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.

Poziom ekspresji RANKL

Wielkość zmiany	Brak	Niski	Średni	Wysoki	Razem
	(0)	(+)	(++)	(+++)	
0,3 – 0,8 cm	0	0	8	9	14
0,9 – 3 cm	0	0	6	12	21
>3	0	0	0	1	1
Razem	0	0	14	22	36

W badanych zmianach okołowierzchołkowych niską ekspresję OPG wykazano u 9 (25%), średnią u 27 (75%). Średni poziom ekspresji OPG stwierdzono przede wszystkim w torbielach korzeniowych (n=13), niski w komórkach ziarniaków okołowierzchołkowych (n=5). Wszystkie zmiany o charakterze torbieli zawiązkowej wykazywały ekspresję OPG na średnim poziomie (*Tabela XI*). Porównując poziom ekspresji OPG z wielkością zmiany, wykazano, że ekspresja na średnim poziomie była w zmianach okołowierzchołkowych o średnicy 0,9 – 3 cm (n=15). Niską ekspresję stwierdzano głównie w ziarniakach o średnicy 0,3 – 0,8 cm (n=6) (*Tabela XII*).

Tabela XI. Ekspresja OPG w zmianach okołowierzchołkowych w badaniu immunohistochemicznym

Poziom ekspresji OPG

Charakter zmiany	Brak	Niski	Średni	Wysoki	Razem
	(0)	(+)	(++)	(+++)	
Ziarniniak okołowierzchołkowy	0	5	9	0	14
Torbiel korzeniowa	0	4	13	0	17
Torbiel zawiązkowa	0	0	5	0	5
Razem	0	9	27	0	36

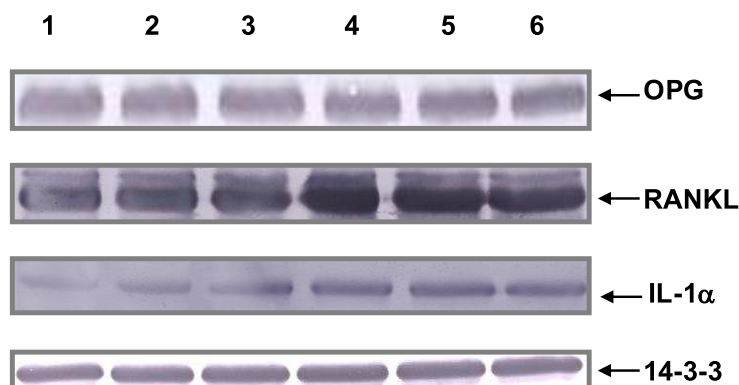
Tabela XII. Ekspresja białka OPG a rozmiar zmian okołowierzchołkowych w badaniu immunohistochemicznym

Poziom ekspresji OPG

Charakter zmiany	Brak	Niski	Średni	Wysoki	Razem
	(0)	(+)	(++)	(+++)	
0,3 – 0,8 cm	0	6	11	0	17
0,9 – 3 cm	0	3	15	0	18
>3	0	0	1	0	1
Razem	0	9	27	0	36

5.4 Wyniki badań molekularnych

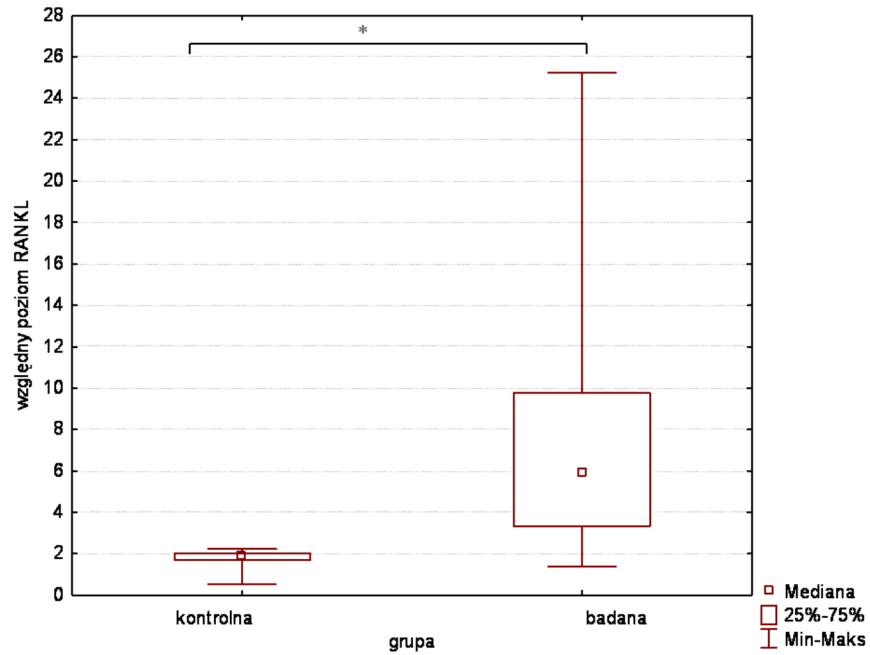
Poziom ekspresji RANKL, OPG i IL-1 α w badanych próbkach oceniono na podstawie pomiaru ilości badanego białka w analizowanych tkankach (Rycina 4).



Rycina 4. Poziom białka OPG, RANKL i IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych wyrostka zębodołowego szczęki i żuchwy o charakterze ziarniniaka, torbieli zapalnej i torbieli zawiązkowej. Przykładowy immunoblot lizatów białkowych analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 100 μ g białka. Ścieżki 1-3 odpowiadają ekstraktom tkankowym z błon śluzowych osób zdrowych a 4-6 z grupy badanej.

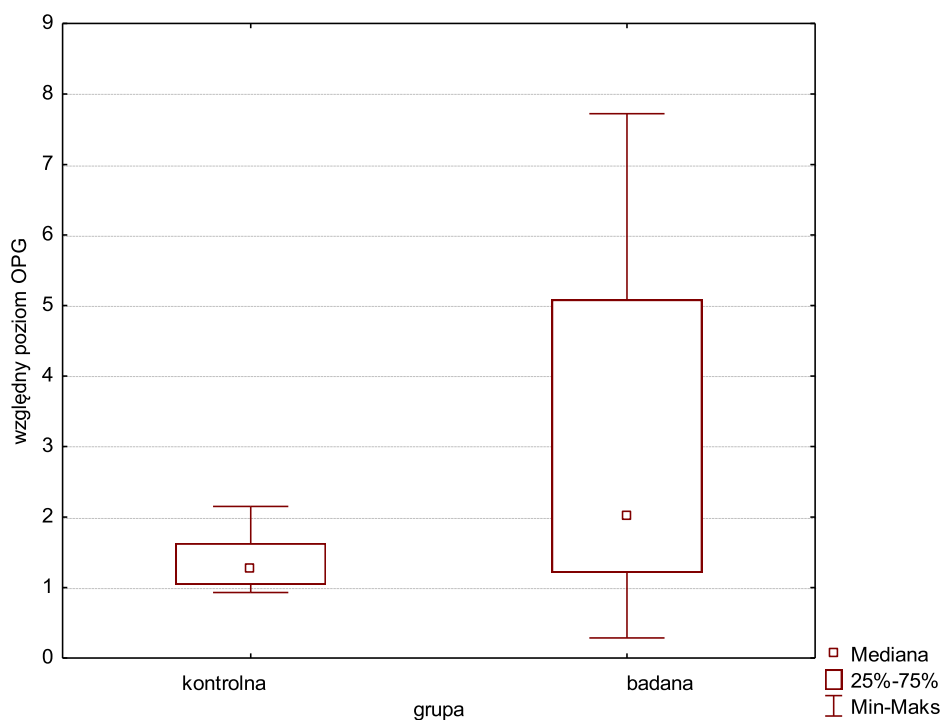
Analiza Western blot wykazała wzrost ekspresji białek RANKL i OPG w zmianach okołowierzchołkowych kości szczęk (ziarniniakach, torbielach korzeniowych i zawiązkowych) w porównaniu z grupą kontrolną (błona śluzowa wyrostka zębodołowego i jęczyczka bez stwierdzonego stanu zapalnego). Poziom ekspresji RANKL (*mediana 6,304623*) w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbieli korzeniowej i torbieli zawiązkowej w znacznym stopniu przewyższał poziom ekspresji tych białek w grupie kontrolnej: RANKL (*mediana 1.877578*) (Rycina 5).

Zaobserwowano również niewielki wzrost ekspresji białka OPG (*mediana* 2,577696) w zmianach okołowierzchołkowych, ale nie był on znamieny statystycznie (*Rycina 6*).



Rycina 5. Poziom ekspresji RANKL w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.

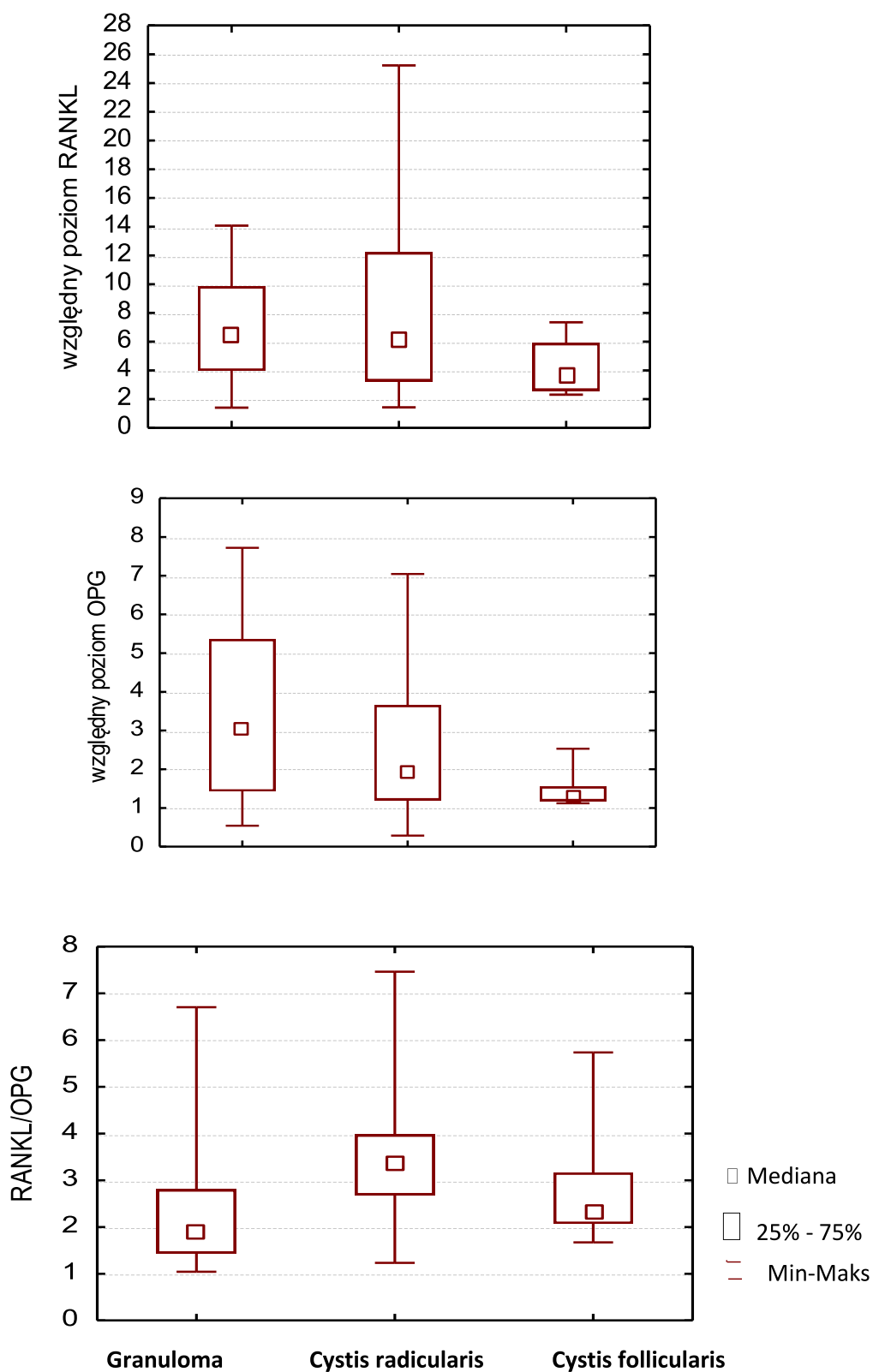
*Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białko referencyjne) * $p \leq 0,000044$ w stosunku do kontroli*



Rycina. 6. Poziom ekspresji OPG w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.

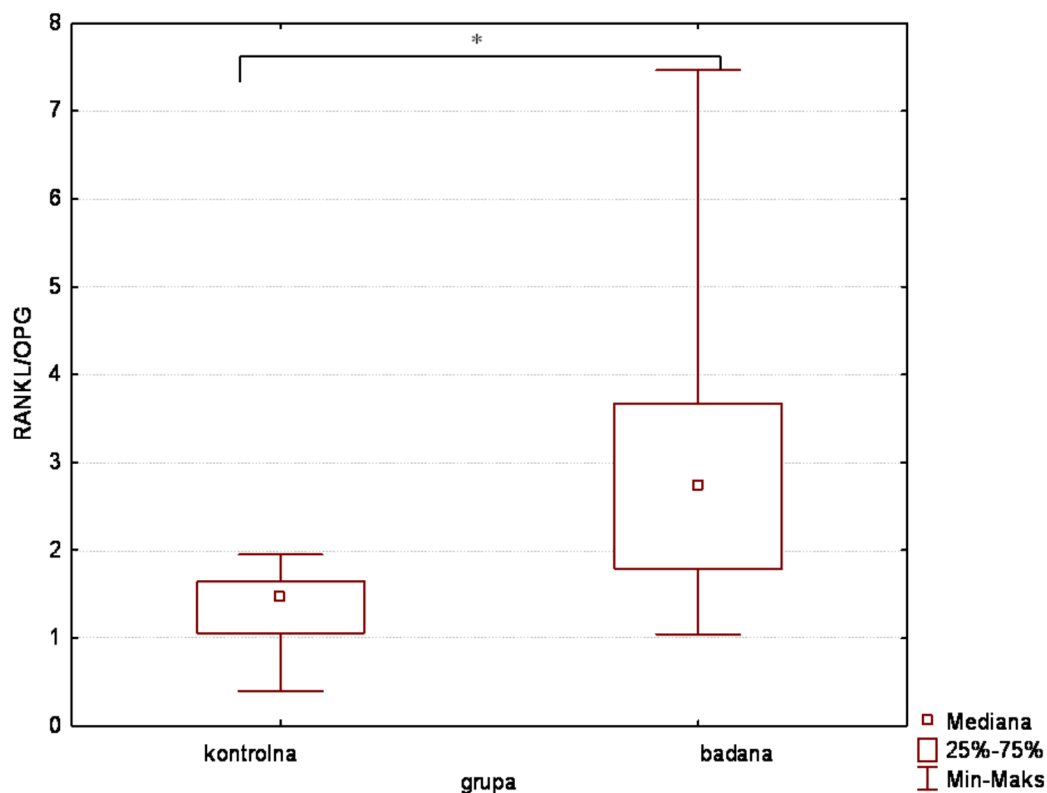
Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białka referencyjnego)

Porównanie poziomu ekspresji białek RANKL, OPG i stosunku RANKL/OPG w trzech rodzajach zmian okołowierzchołkowych nie wykazała istotnych statystycznie różnic (Rycina 7). Jednakże zaobserwowano niewielki wzrost białka RANKL, a spadek OPG w torbieni zapalnej w porównaniu do ziarniniaka. Natomiast w torbieni zawiązkowej, zarówno ekspresja RANKL, jak i OPG była na niskim poziomie.



Rycina 7. Poziom ekspresji RANKL, OPG i stosunek RANKL/OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych grupy badanej

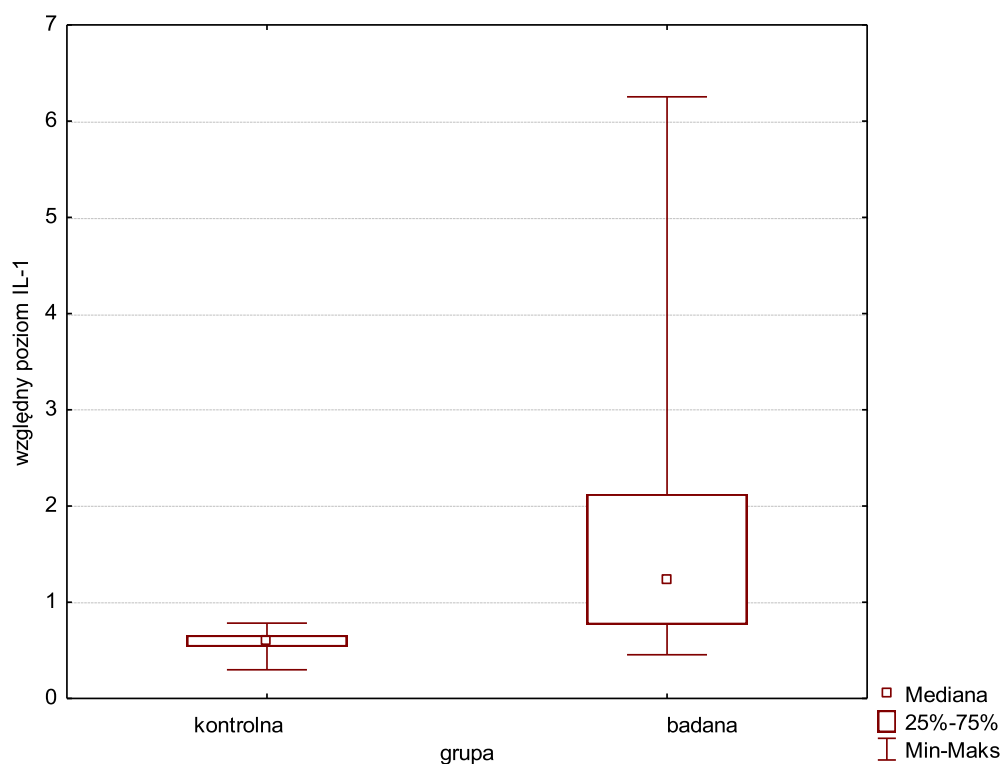
Stosunek RANKL/OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i zawiązkowych (*mediana 2,729644*), był znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej (*mediana 1,475255*) (*Rycina 8*).



Rycina 8. Stosunek RANKL/OPG w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.

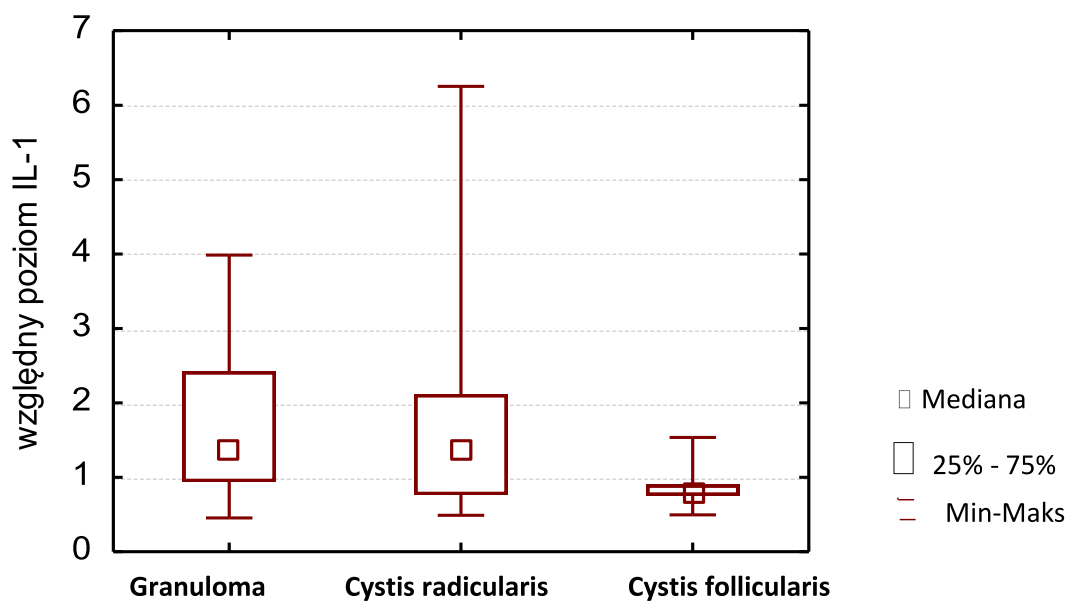
* $P \leq 0,0000381$ w stosunku do kontroli

Ponadto analiza Western blot wykazała wzrost ekspresji IL-1 α w grupie badanej (*mediana 1,175971*) w porównaniu z grupą kontrolną (*mediana 0,606518*) (*Rycina 9*). Nie wykazano znamienych statystycznie różnic ekspresji IL-1 α w poszczególnych rodzajach zmian chorobowych (*Rycina 10*).



Rycina 9. Poziom ekspresji IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.

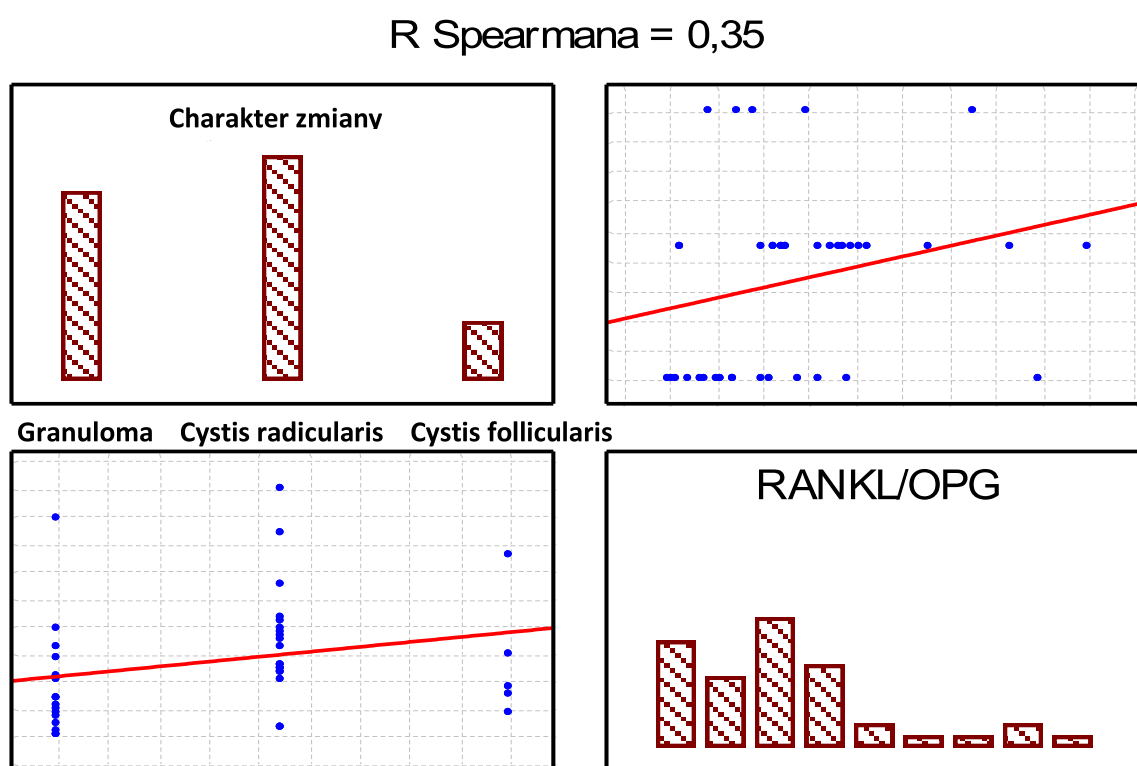
Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białka referencyjnego) * $p \leq 0,000044$ w stosunku do kontroli



Rycina 10. Poziom ekspresji IL-1 α w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych grupy badanej

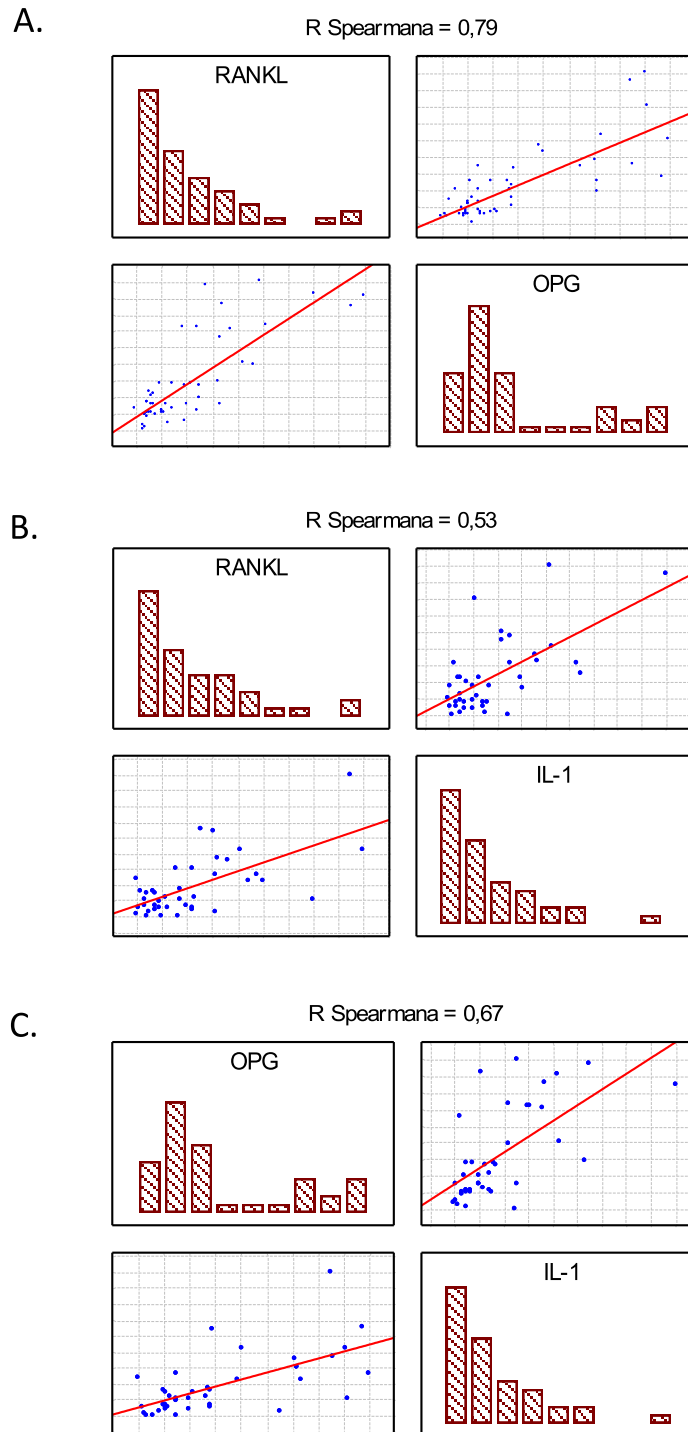
Wzajemna korelacja pomiędzy poziomami białek określono poprzez wyliczenie współczynnika rang Spearmana.

Przeprowadzona analiza wykazała słabą korelację pomiędzy RANKL/OPG a poszczególnymi rodzajami zmian w grupie badanej (R Spearmana = 0,35) (Rycina 11). Widoczna była różnica RANKL/OPG w torbielach zapalnych w porównaniu do ziarniniaka.



Rycina 11. Korelacja pomiędzy stosunkiem RANKL/OPG a charakterem zmiany okołowierzchołkowej korzeni zębów, $p \leq 0,005$

Analiza statystyczna wzajemnych zależności między poziomami badanych białek wykazała silną korelację pomiędzy ilością białka RANKL i OPG w zmianach chorobowych (R Spearmana = 0,79) (*Rycina. 12A*). Może to sugerować, że ekspresja RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w zmianach okołowierzchołkowych. Ponadto poziom białek RANKL i OPG dodatnio korelował z poziomem cytokiny prozapalnej (IL-1 α) w grupie badanej (*Rycina. 12 B i C*). IL-1 α może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu reakcji zapalnej.



Rycina 12. Współzależności pomiędzy poziomami badanych białek w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów

A. Korelacja między ilością białka RANKL i OPG

B. Korelacja pomiędzy ilością białka RANKL a ilością cytokiny IL-1 α

C. Korelacja pomiędzy ilością białka OPG a ilością cytokiny IL-1 α

R – Spearman – współczynnik korelacji rang Spearmana przy $p \leq 0,05$

6. Omówienie i dyskusja

Każdy materiał tkankowy pobrany od chorego ze zmianą okołowierzchołkową poddano rutynowemu badaniu histopatologicznemu w celu ostatecznego określenia jej charakteru. W analizowanym materiale najczęściej rozpoznawano torbiele korzeniowe 19 (47,5%), drugą co do częstości był ziarniniak okołowierzchołkowy 16 (40%), oraz torbiele zawiązkowe 5 (12,5%). W grupie badanej, zmiany patologiczne występowały głównie u mężczyzn w przedziale wiekowym od 30 do 60 roku życia. Powyższe obserwacje znajdują potwierdzenie w piśmiennictwie. Meningaud i wsp. w badaniu retrospektywnym z 2006 roku, mającym na celu określenie częstości występowania poszczególnych typów torbieli zębopochodnych, przeprowadzonym na 695 pacjentach wykazał, że torbiele zapalne stanowiły 58,2%, z czego w większości byli to mężczyźni w przedziale wiekowym do 60 roku życia (99). Podobne wyniki przedstawił w swej pracy Pawlak i wsp., gdzie torbiele korzeniowe stanowiły 62%, torbiele zawiązkowe 31% (16). W publikacji Kozarzewskiej i wsp. dane dotyczące częstości występowania torbieli korzeniowych znacznie odbiegają od prezentowanych w innych publikacjach: torbiele korzeniowe stanowiły 89,9%, torbiele zawiązkowe 9,5% (100). García i wsp. analizując doniesienia wielu autorów, wykazał, że najczęstszą przewlekłą zmianą zapalną okolicy wierzchołków korzeni zębów jest ziarniniak okołowierzchołkowy, natomiast torbiele korzeniowe występują w około 18% przypadków przewlekłych zmian okołowierzchołkowych korzeni zębów (101). Badania histopatologiczne 100 zmian okołowierzchołkowych przeprowadzone przez Love i wsp. w 2009 roku, potwierdzają te wyniki (102). Autorzy ci wykazali, że torbiele korzeniowe stanowią zaledwie 18% spośród wszystkich zmian zapalnych

tkanek okołowierzchołkowych, podczas gdy zapalenia ziarninowe stanowią 77% badanych przypadków (102). Różnice w występowaniu poszczególnych typów zmian okołowierzchołkowych w badanym materiale, mogą być spowodowane stosunkowo niewielką grupą badanych. Bartkowski i wsp. podaje, iż występowanie torbieli zapalnych w szczęce jest niemal trzykrotnie częstsze niż w żuchwie (103). Podobne spostrzeżenia poczyniła Kozarzewska i wsp. W jej badaniach torbiele lokalizowały się głównie w szczęce (59,6%), żuchwę obejmowało 37,2% zmian (100). Odmienne wyniki przedstawił Meningauda i wsp., w jego badaniach torbiele najczęściej występowały w żuchwie (67,5%) (99). W materiale Pawlaka i wsp. w 52% przypadków torbiele zapalne lokalizowały się w obrębie żuchwy. W materiale własnym najczęstszą lokalizacją torbieli korzeniowej była szczęka (63,15%), ziarniniaka okołowierzchołkowego - kość żuchwy (56,25%), torbieli zawiązkowej – żuchwa w okolicy zębów ósmych (80%). Wielkość usuwanych zmian w większości przypadków zawierała się w przedziale od 8 do 30 mm. Podobne obserwacje poczyniły Chabrzyk – Antosik i Lewandowska. Przeprowadzona przez nie analiza wielkości torbieli zapalnych w szczęce i żuchwie wykazała, że najczęściej osiągają one rozmiary do 4 cm (104).

W całej grupie badanych chorych, 52,5% deklarowało brak przewlekłych dolegliwości ogólnoustrojowych. Żaden z chorych nie przyjmował przewlekle leków przeciwzapalnych. 10 pacjentów przyjmowało antybiotyki w okresie do 2 tygodni przed zabiegiem usunięcia zmiany okołowierzchołkowej zęba, w tym 7 z powodu dolegliwości bólowych. Wśród pacjentów z chorobami ogólnoustrojowymi najczęstszym schorzeniem było nadciśnienie tętnicze, w drugiej kolejności cukrzyca insulinoniezależna. W 3 przypadkach te dwa schorzenia współistniały.

35% pacjentów z grupy badanych zgłosiło się w celu ekstrakcji zęba z powodu dolegliwości bólowych okolicy zmiany.

U 17 (42,5%) pacjentów podczas badania przedmiotowego stwierdzono obecność nacieku zapalnego w okolicy zmiany chorobowej. W jednym przypadku stwierdzono deformację wyrostka zębodołowego szczęki i zaburzenie symetrii twarzy. U żadnego z badanych pacjentów nie wykazano objawu Dupuytrena. W 75% zmiana chorobowa była wykrywana przypadkowo na zdjęciach rentgenowskich podczas leczenia współwystępujących schorzeń jamy ustnej lub w trakcie diagnostyki przed planowaną sanacją jamy ustnej. Ci pacjenci nie zgłaszali żadnych dolegliwości spowodowanych obecnością zmian. Według danych z piśmiennictwa zmiany okołowierzchołkowe są wykrywane przypadkowo na zdjęciach rentgenowskich, lub w miarę powiększania się zmiany, gdy dochodzi do niszczenia blaszki kostnej wyrostka zębodołowego, parastezji w obrębie wargi górnej lub dolnej, lub w przypadku wystąpienia powikłania zapalnego, na przykład zropienia torbieli (15, 22, 100, 103). U żadnego z badanych pacjentów nie występowały objawy czucia opacznego w zakresie nerwów czaszkowych.

Analiza immunohistochemiczna badanych tkanek (ziarniniaków okołowierzchołkowych oraz 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.

Poziom ekspresji osteoprotegeryny w badanych zmianach okołowierzchołkowych był znacząco niższy aniżeli RANKL. Komórki OPG pozytywnie 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 poszczególnych rodzajach zmian (ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych) można wyciągnąć wniosek, że pomimo pewnych różnic w ilości pozytywnie wybarwionych komórek, charakter zmiany nie ma znaczącego wpływu na stosunek RANKL/OPG. Do zbliżonych wniosków doszedł również Menezes i wsp. Autorzy ci badali immunohistochemicznie ziarniniaki okołowierzchołkowe i torbiele zapalne, która 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 moich badaniach jak i cytowanych autorów (4).

W warunkach fizjologicznych istnieje równowaga pomiędzy RANKL a OPG, a 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 (42, 55, 59). W niniejszej pracy badaniom poddano pobrany od pacjentów materiał tkankowy, który stanowiły trzy rodzaje zmian okołowierzchołkowych wyrostka zębodołowego kości szczęk: ziarniniaki okołowierzchołkowe, torbiele korzeniowe i torbiele zawiązkowe. 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. Grupę kontrolną dla badań molekularnych stanowiła zdrowa błona śluzowa języczka i wyrostka zębodołowego bez stwierdzonego stanu zapalnego. Analiza Western blot wykazała znaczny wzrost poziomu ekspresji białka RANKL we wszystkich zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto w tych zmianach chorobowych zaobserwowano niewielki wzrost poziomu białka OPG, który nie był jednak znamienny statystycznie. Uzyskane wyniki badań są zgodne z danymi przedstawionymi przez Menezesa i wsp. w 2008 roku. Autorzy ci przy pomocy metody RealTime-PCR wykazali wzrost ekspresji OPG i RANKL na poziomie mRNA w zmianach okołowierzchołkowych (33). W moich 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) (4, 36).

Z moich badań wynika, że porównanie poziomu białek RANKL i OPG oraz stosunku RANKL/OPG w trzech rodzajach zmian (ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i torbielach zawiązkowych) nie wykazało znamienych statystycznie różnic. W torbieldzi korzeniowej stwierdzono niewielki wzrost ekspresji białka RANKL a obniżenie OPG w odniesieniu do ziarniniaka. Ekspresja RANKL i OPG w torbieldzi zawiązkowej była na niskim poziomie. Nie były to różnice znamienne statystycznie. Należy jednak pamiętać, że obserwacje te poczyniono na małej grupie chorych i wymagają one dalszych badań na większej grupie chorych. Ekspresja RANKL, OPG i stosunek RANKL/OPG pomiędzy poszczególnymi typami zmian chorobowych a grupą kontrolną były znacząco wyższe w grupie badanej. Uzyskane przeze mnie wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów (4, 33, 36, 105). Analiza statystyczna wykazała silną korelację pomiędzy białkami RANKL a OPG w zmianach okołowierzchołkowych. W stanach patologicznych, ekspresja RANKL i OPG jest dodatnio ze sobą sprzężona. Wzrost ekspresji RANKL wiąże się ze wzrostem poziomu białka OPG, jednak z zachowaniem proporcji $RANKL > OPG$. Dane te korespondują z wynikami Menezesa i wsp, który badaniem metodą RealTime-PCR wykazał silny wzrost ekspresji białek RANKL i OPG w zmianach zapalnych, jednakże zaznaczając wyższy poziom białka RANKL w stosunku do OPG (33). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że ten niewielki obserwowany wzrost poziomu OPG w stanach zapalnych stanowi reakcję obronną organizmu na patologiczny proces resorpcji kości. Ekspresja IL-1 α w badanym materiale tkankowym, wykazała znaczny wzrost w poszczególnych typach badanych tkanek w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono znamienych

statystycznie różnic w ekspresji IL-1 α pomiędzy ziarniniakami okołowierzchołkowymi oraz torbielami korzeniowymi i zawiązkowymi. Ponadto wykazano dodatnią korelację pomiędzy poziomem białka OPG i RANKL z poziomem IL-1 α w grupie badanej. W 2008 roku Mugali i wsp. opublikowali wyniki badań poziomu cytokin w torbielach zapalnych. Przeprowadzone przez nich badania metodą immunoenzymatyczną ELISA wykazały, że poziom IL-1 α w torbielach korzeniowych był najwyższy wśród występujących cytokin prozapalnych (106). Zwiększoną ekspresję IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych stwierdziła również Rittling i wsp. (105) oraz Kusumi i wsp. w 2004 roku prowadząc badania cytokin w torbielach korzeniowych metodą RT-PCR (106). Wcześniej, w 2000 roku Kubota i wsp. udowodnili, że wzrost ekspresji IL-1 α wpływa także na aktywację metaloproteinaz i pełni znaczącą rolę w ekspansji torbieli zębopochodnych (34). Powyższe dane z przytoczonych publikacji oraz pracy własnej sugerują, że IL-1 α może być jednym z głównych czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu reakcji zapalnej, co prowadzi do zwiększenia aktywności osteoklastów i wystąpienia resorpcji kości (34, 106, 107). Można przyjąć, że wzrost ekspresji RANKL w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych oraz torbielach zawiązkowych, jest indukowany przez ekspansję tych zmian. Synteza prozapalnej cytokiny IL-1 α , dodatkowo wzmacnia ekspresję RANKL, przez co następuje aktywacja osteoklastów i wzmożona resorpcja kości (108). Uzyskane wyniki badań immunohistochemicznych i molekularnych świadczą o wpływie RANKL, OPG i IL-1 α na przebieg procesu resorpcji kości w szczęcie i żuchwie. Moje obserwacje są jednak tylko fragmentem całego procesu niszczenia kości i dla potwierdzenia wymagają dalszych badań na większej grupie chorych.

7. Wnioski

1. W badaniach immunohistochemicznych i molekularnych zmian okołowierzchołkowych szczęki i żuchwy wykazano obecność RANKL i OPG.
2. W ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i zawiązkowych stwierdza się wzrost ekspresji RANKL, OPG i IL-1 α w porównaniu do grupy kontrolnej.
3. Zwiększona ekspresja RANKL w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach korzeniowych i torbielach zawiązkowych może świadczyć o wpływie tego białka na proces resorpcji kości.
4. Zaburzenie stosunku RANKL/OPG ma decydujący wpływ na przebieg procesu resorpcji kości w zmianach okołowierzchołkowych.
5. Wzrost ekspresji OPG w niektórych zmianach okołowierzchołkowych może świadczyć o reakcji obronnej organizmu przed patologiczną degradacją kości.
6. W przewlekłych zmianach zapalnych okolicy korzeni zębów dochodzi do wzrostu ekspresji IL-1 α , która stymuluje wydzielanie czynnika RANKL odpowiedzialnego za różnicowanie osteoklastów i nasilenie procesu resorpcji.
7. Skutkiem wzmożonej aktywności RANKL i IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych jest powstawanie rozległych ubytków kostnych.

8. Piśmiennictwo

1. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2000; 2(10): 1181-1192.
2. García CC, Diago MP, Mira BG, Sebastián JV, Sempere FV. Expression of cytokeratins in epithelialized periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 43-46.
3. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6): 348-381.
4. Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W i wsp. Receptor activator NFkappaB-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.
5. 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.
6. Mårton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 15(3): 139-150.

7. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(4): 498-521.
8. Toller P. Origin and growth of cysts of the jaws. *Ann R Coll Surg Engl.* 1967; 40(5): 306-336.
9. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO histological typing of odontogenic tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer.* 1992; 70(12): 2988-2994.
10. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. WHO typing of odontogenic tumours. *Cancer* 1992; 70: 15.
11. Kaczmarzyk T, Stypułkowska J, Tomaszewska R, Czopek J. Nowotwory zębopochodne i guzy nowotworopodobne kości szczękowych. Podręcznik dla studentów i lekarzy. Warszawa; Kwintesencja: 2009.
12. Prockt AP, Schebela CR, Maito FD, Sant'Ana-Filho M, Rados PV. Odontogenic cysts: analysis of 680 cases in Brazil. *Head Neck Pathol.* 2008; 2(3): 150–156.

13. Wziątek-Kuczmik D, Radzioch J, Pająk J, Niedzielska I, Drugacz J. Analiza porównawcza obrazu kliniczno-morfologicznego szkliwiaków i torbieli zębopochodnych żuchwy w materiale Katedry i Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. *Chir Pol.* 2007; 9(4): 212-217.
14. Dunlap C. *Cysts of the jaws.* Kansas City: University of Missouri, School of Dentistry; 2000. s. 2–8.
15. Lato S, Shah A, Jan SM, Qadir S, Ahmed I, Purra AR i wsp. Radicular cyst. *JK Sci.* 2009; 11(4) :187-189.
16. Pawlak W, Kubasiewicz–Ross P, Pałka Ł, Zarzycki R. Torbiele kości szczęk leczone w Klinice Chirurgii Szczękowo–Twarzowej Akademii Medycznej we Wrocławiu w latach 2004–2007. *Dent Med Probl.* 2009; 46(1): 49–53.
17. El Gehani R, Krishnan B, Orafi H. The prevalence of inflammatory and developmental odontogenic cysts in a Libyan population. *Libyan J Med.* 2008; 3(2): 75-77.
18. Ratajczak M, Sowa W, Walter A. Molekularne podstawy powstawania zębopochodnej torbieli zapalnej przegląd piśmiennictwa. *Dent Med Probl.* 2010; 47(4): 496–501.
19. Nair PN, Sundqvist G, Sjögren U. Experimental evidence supports the abscess theory of development of radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(2): 294-303.

20. Shear M, Speight P. Radicular cyst and residual cyst. In: cyst of the oral and maxillofacial regions. 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2007. s. 123-142.
21. Meghji S, Qureshi W, Henderson B, Harris M. The role of endotoxin and cytokines in the pathogenesis of odontogenic cysts. *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 523-531.
22. Tyndorf MM, Manowska B, Arkuszewski P. Przydatność klasycznych zdjęć rentgenowskich we wstępnej ocenie zmian w zuchwie o charakterze torbieli. *Wiad Lek.* 2008; 61(10–12): 258–262.
23. Dominiak M, Łysiak K, Znamirowska A, Szczepański W, Hałoń A. Porównanie zgodności rozpoznania przewlekłych zmian okołowierzchołkowych. *Dent Med Probl.* 2006; 43: 504–510.
24. Slootweg PJ. Lesions of the jaws. *Histopathology* 2009; 54(4): 401-418.
25. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003; 36(7): 464-471.
26. Philippi CK, Rados PV, Sant'ana Filho M, Barbachan JJ, Quadros OF. Distribution of CD8 and CD20 lymphocytes in chronic periapical inflammatory lesions. *Braz Dent J.* 2003; 14(3): 182-186.

27. Kozarzewska M, Wojtowicz A, Siemińska J. Rola metaloproteinaz w etiopatogenezie zębopochodnych torbieli kości szczęk. *Nowa Stomatol.* 2005; 2: 81-88.
28. Muglali M, Komerik N, Bulut E, Yarim GF, Celebi N, Sumer M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(3): 185-189.
29. Konopka T, Kopeć W. Serum levels of soluble adhesion molecules in periodontitis. *Dent Med Probl.* 2003; 40(1): 23–28.
30. Jankowska-Antczak E, Wojtowicz A. Aktualne poglądy na temat patogenezy zapalenia tkanek okołowierzchołkowych. *Nowa Stomatol.* 2005; 2: 94-97.
31. Manowska B, Arkuszewski P, Kobos J, Grodecka J. Ocena ekspresji metaloproteinaz 1 i 2 (MMP-1 i MMP-2) oraz inhibitora metaloproteinaz (TIMP-3) w torbielach i nowotworach zębopochodnych części twarzowej czaszki. *Czas Stomatol.* 2009; 62(4): 271-280.
32. 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.

33. Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C i wsp. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa 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.
34. Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. Interleukin-1 α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of odontogenic jaw cysts. *J Dent Res.* 2000; 79(6): 1423-1430.
35. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ i wsp. Chemokines and chemokine receptors in periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 310–316.
36. Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M i wsp. Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontol Res.* 2003; 38: 380-387.
37. Dunfee BL, Sakai O, Pistey R, Gohel A. Radiologic and pathologic characteristics of benign and malignant lesions of the mandible. *Radiographics* 2006; 26(6): 1751-1768.
38. Bodner L, Woldenberg Y, Bar-Ziv J. Radiographic features of large cystic lesions of the jaws in children. *Pediatr Radiol.* 2003; 33(1): 3-6.

39. Scholl RJ, Kellett HM, Neumann DP, Lurie AG. Cysts and cystic lesions of the mandible: clinical and radiologic-histopathologic review. *Radiographics* 1999; 19(5): 1107-1124.
40. Arabska-Przedpeńska B, Buczkowska-Radlińska J, Jańczuk Z, Kaczmarek U, Lisiecka K, Piątkowska D i wsp. *Stomatologia zachowawcza: zarys kliniczny*. Warszawa: PZWL; 2006.
41. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000. 1997; 14: 158-72.
42. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1143: 123-150.
43. Kryśkiewicz E, Lorenc RS. Szlak RANKL/RANK/OPG i jego znaczenie w fizjologii i patofizjologii kości. *Terapia* 2006; 14: 58-63.
44. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000; 24: 99-126.
45. Witas HW, Wujcicka WI. Genetyczne wyznaczniki osteoporozy. *Post Biol Kom*. 2007; 34(3): 495-509.

46. Kmiec Z, Sokołowska I. Rola cytokin z rodziny czynnika martwicy nowotworu w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów – nowe możliwości terapii. *Pol Merk Lek.* 2007; 22(130): 300-304.
47. Witkowska – Zimny M, Wróbel E, Przybylski J. Najważniejsze czynniki transkrypcyjne procesu osteoblastogenezy. *Post Biol Kom.* 2009; 36(4): 695-705.
48. Kuczkowski J, Sakowicz-Burkiewicz M, Iżycka-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.
49. Roodman GD. Osteoclast differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2(3): 389-409.
50. Aubin JE, Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteopor Int.* 2000; 11(11): 905-913.
51. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999; 27(8): 1229-1241.

52. Mizukami J, Takaesu G, Akatsuka H, Sakurai H, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K i wsp. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(4): 992-1000.
53. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev.* 2008; 29(4): 403-440.
54. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20(3): 345-357.
55. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 139-146.
56. Ross FP. Cytokine regulation of osteoclast formation and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003; 3(4): 282-286; discussion: 292-294.
57. 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.

58. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: 131–139.
59. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthrit Res Ther.* 2007; 9(Suppl 1):S1.
60. Haynes DR. Bone lysis and inflammation. *Inflamm Res.* 2004; 53(11): 596-600.
61. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 2007; 32(2): 103-110.
62. Hill PA i wsp. Bone remodeling. *Br J Ophthal.* 1998; 25: 101-107.
63. Nowak Z, Konieczna M, Saracyn M, Wańkiewicz Z. Winianooporna kwasna fosfataza – TRACP-5b jako nowoczesny marker resorpcji kości. *Pol Merk Lek.* 2008; 24(142): 351-354.
64. Gołąb J, Jakubisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia.* Wyd 2. Warszawa: PWN; 1996.
65. Lee SH, Kim TS, Choi Y, Lorenzo J. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *Biochem Mol Biol Rep.* 2008; 41(7): 495-510.
66. Stanisławowski M, Kmiec Z. Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Post Hig Med Dosw.* 2009; 63: 234-241.

67. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(1): 17-34.
68. Dahlen G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res.* 1980; 59(6): 1033-1040.
69. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev.* 1996; 60(2): 316-341.
70. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009; 47(1): 101-113.
71. Colić M, Lukić A, Vucević D, Milosavljević P, Majstorović I, Marjanović M i wsp. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their in vitro production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12): 1120-1130.
72. Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(1): 25-31.

73. Menezes R, Garlet TP, Trombone AP, Repeke CE, Letra A, Granjeiro JM i wsp. The potential role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod.* 2008; 34(12): 1480–1484.
74. de Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL: High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod.* 2009; 35(9): 1234-1242.
75. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001; 92(3): 460-70.
76. Ostrowska Z, Kos-Kudła B, Szapska B, Marek B, Kajdaniuk D, Ordon M i wsp. Wpływ leptyny na tkankę kostną. *Endokrynol. Otył. Zab. Przem. Mat.* 2008; 4(3): 26–29.
77. Merendino D, Costanza D, Maggio C, Sarakatsianou V, Sferrazza S, Abruzzese A i wsp. 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.
78. Anandarajah AP, Schwarz EM. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: mechanisms and potential clinical applications. *J Cell Biochem.* 2006; 97: 226–232.

79. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S i wsp. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(7): 3597-602.
80. Zdzisińska B, Kandefer-Szerszeń M. Rola RANK/RANKL i OPG w szpiczaku plazmocytowym. *Post. Hig Med Dosw*. 2006; 60: 471-482.
81. Hamdy NA. Osteoprotegerin as a potential therapy for osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2006; 8(1): 50-4.
82. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 2006; 107(2): 289-298.
83. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T i wsp. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Gen Dev*. 1999; 13(18): 2412-2424.
84. Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation.. *J Exp Med*. 1999; 189(7): 1017-1020.

85. Seshasayee D, Wang H, Lee WP, Gribling P, Ross J, Van Bruggen N i wsp. A novel in vivo role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30202-30209.
86. Josien R, Wong BR, Li HL, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J Immunol.* 1999; 162(5): 2562-2568.
87. Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K i wsp. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* 2001; 98(8): 2544-2554.
88. Wong BR, Josien R, Lee SY, Vologodskaja M, Steinman RM, Choi Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem.* 1998; 273(43): 28355-28359.
89. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller-Ziegler L, Rossi B. The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J.* 2003; 17(12): 1751-1753.
90. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5050-5055.

91. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273(32): 20551-20555.
92. Chikazu D i wsp. Osteoclast differentiation by fgf-2. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 2074 –2081.
93. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol.* 2002; 169(6): 3353-3362.
94. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell.* 2008; 31(6): 918-924.
95. Boyce BF, Li P, Yao Z, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM i wsp. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med.* 2005; 54(3): 127-131.
96. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F i wsp. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med.* 2005; 202(5): 589-595.

97. Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem.* 2002; 277(46): 44347-44356.
98. Waterborg JH, Matthews HR. The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994; 32: 1-4.
99. Meningaud JP, Oprean N, Pitak-Arnop P, Bertrand JC. Odontogenic cysts: a clinical study of 695 cases. *J Oral Sci.* 2006; 48(2): 59-62.
100. Kozarzewska M, Popowski W, Wojtowicz A. Częstość występowania torbieli zębopochodnych w materiale Zakładu Chirurgii Stomatologicznej IS AM w Warszawie w latach 1996-1999. *Nowa Stomatol.* 2001; 2: 15-18.
101. García CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12(8): 585-590.
102. Love RM, Firth N. Histopathological profile of surgically removed persistent periapical radiolucent lesions of endodontic origin. *Int Endod J.* 2009; 42(3): 198-202.

103. Kurek M, Panaś M, Stypułkowska J, Zapała J, Serwatka F, Bartkowski B i wsp. Chirurgia szczękowo–twarzowa: podręcznik dla studentów i lekarzy. Wyd. 3. Kraków: Collegium Medicum UJ; 1996.
104. Chabrzyk–Antosik O, Lewandowska M. Torbiele zębopochodne w materiale Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Akademii Medycznej w Poznaniu. Dental Forum. 2004; 1: 67-71.
105. Rittling SR, Zetterberg C, Yagiz K, Skinner S, Suzuki N, Fujimura A i wsp. Protective role of osteopontin in endodontic infection. Immunology 2010; 129(1): 105-114.
106. Muglali M, Komerik N, Bulut E, Yarim GF, Celebi N, Sumer M. Cytokine and chemokine levels in radicular and residual cyst fluids. J Oral Pathol Med. 2008; 37(3): 185–189.
107. Kusumi A, Sakaki H, Fukui R, Satoh H, Kusumi T, Kimura H. High IL-6 synthesis in cultured fibroblasts isolated from radicular cysts. Arch Oral Biol. 2004; 49(8): 643-652.
108. Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H i wsp.: Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103(5): 707-711.

9. Załączniki

9.1 Świadoma zgoda pacjenta

SZLAK RANKL/RANK/OPG W PRZEWLEKŁYCH ZAPALENIACH TKANEK OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH W SZCZĘCE I ŻUCHWIE

1. Badania zostaną przeprowadzone na materiale tkankowym pobranym od pacjenta podczas zabiegów chirurgicznych takich jak: ekstrakcja zęba, resekcja, wyłuszczenie torbieli zębopochodnej z powodu zmian chorobowych szczęki lub żuchwy.
2. Możliwe powikłania związane z zabiegiem chirurgicznym: ból poekstrakcyjny, obrzęk tkanek miękkich, zaburzenia czucia w obrębie nerwu trójdzielnego
3. Materiał tkankowy zostanie wysłany do Laboratorium Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w celu określenia charakteru zmiany i przeprowadzenia badań immunohistochemicznych.
4. Wszystkie informacje dotyczące danych pacjentów są objęte tajemnicą lekarską i nie będą upubliczniane.
5. Pacjent ma prawo do odmowy wykorzystania pobranego materiału w celu dalszych badań naukowych.

Wyrażam zgodę na zabieg chirurgiczny ekstrakcji/resekcji wierzchołka korzenia* zęba/zębów* oraz wyłuszczenia zmian okołowierzchołkowych.

Wyrażam zgodę na wykorzystanie pobranego materiału do dalszych badań naukowych.

Oświadczam iż zostałem poinformowany o wszelkich możliwych powikłaniach związanych z zabiegiem chirurgicznym.

.....

Podpis pacjenta

.....

Podpis lekarza

Gdańsk dn

9.2 Karta badania pacjenta

Numer księgi głównej	
Numer preparatu	
Imię i Nazwisko	
Płeć	
Wiek	
Zawód	

WYWIAD OGÓLNOLEKARSKI

Choroby przewlekłe	
Przyjmowane leki	
Sterydoterapia	
Terapia hormonalna	
Chemioterapia	
Radioterapia	
Alergie	
Palenie tytoniu	
Spożywanie alkoholu	

WYWIAD OGÓLNOSTOMATOLOGICZNY

Ostatnia wizyta u stomatologa	
Dolegliwości bólowe ze strony zębów	
Przebieg dotychczasowego leczenia stomatologicznego	

BADANIE PRZEDMIOTOWE

ZEWNĄTRZUSTNE	
Symetria twarzy	
Węzły chłonne podżuchwowe	

WEWNĄTRZUSTNE

Przedśionek jamy ustnej	
Stan uzębienia	8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8
	8 7 6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7 8
Stan przyzębia	

STAN MIEJSCOWY

Kiedy wykryto zmianę?	
Czy występowały/występują dolegliwości bólowe okolicy zmiany?	
Czy występowały zaburzenia czucia w obrębie bródki, wargi dolnej po stronie zmiany?	
Przebieg dotychczasowego leczenia zęba przyczynowego	
Błona śluzowa okolicy zmiany	

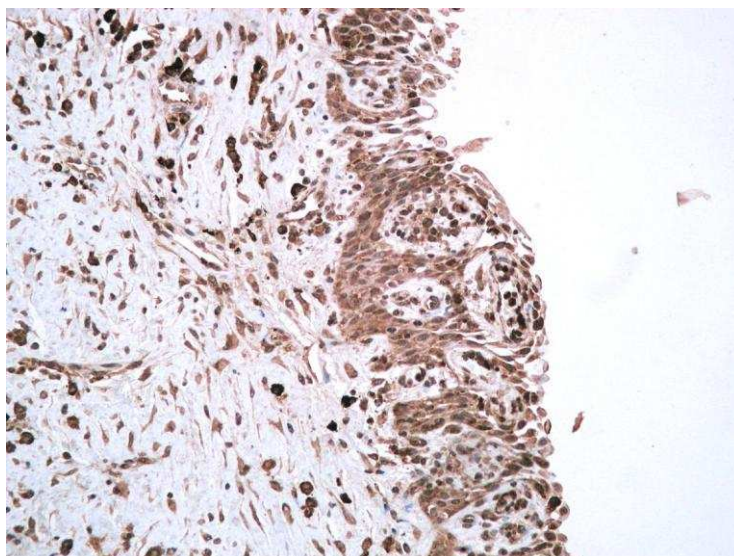
9.3 Ekspresja białka RANKL i OPG w zmianach okołowierzchołkowych (metoda immunohistochemiczna)

l.p.	Charakter zmiany	RANKL	OPG
1.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	2+
2.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	2+
3.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	2+
4.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	2+
5.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	1+
6.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	2+
7.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	1+
8.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	2+
9.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	1+
10.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	2+
11.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	2+
12.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	2+	2+
13.	Ziarniniak okołowierzchołkowy	3+	1+
14.	Torbiel zawiązkowa	3+	2+
15.	Torbiel zawiązkowa	3+	2+
16.	Torbiel zawiązkowa	2+	2+
17.	Torbiel zawiązkowa	3+	2+
18.	Torbiel zawiązkowa	3+	2+
19.	Torbiel zawiązkowa	3+	2+
20.	Torbiel zapalna	3+	2+
21.	Torbiel zapalna	3+	2+
22.	Torbiel zapalna	2+	2+
23.	Torbiel zapalna	2+	1+
24.	Torbiel zapalna	3+	2+
25.	Torbiel zapalna	2+	1+
26.	Torbiel zapalna	2+	1+
27.	Torbiel zapalna	2+	2+
28.	Torbiel zapalna	3+	2+
29.	Torbiel zapalna	2+	2+
30.	Torbiel zapalna	3+	2+
31.	Torbiel zapalna	3+	2+
32.	Torbiel zapalna	3+	1+
33.	Torbiel zapalna	3+	2+
34.	Torbiel zapalna	3+	2+
35.	Torbiel zapalna	3+	2+
36.	Torbiel zapalna	3+	2+

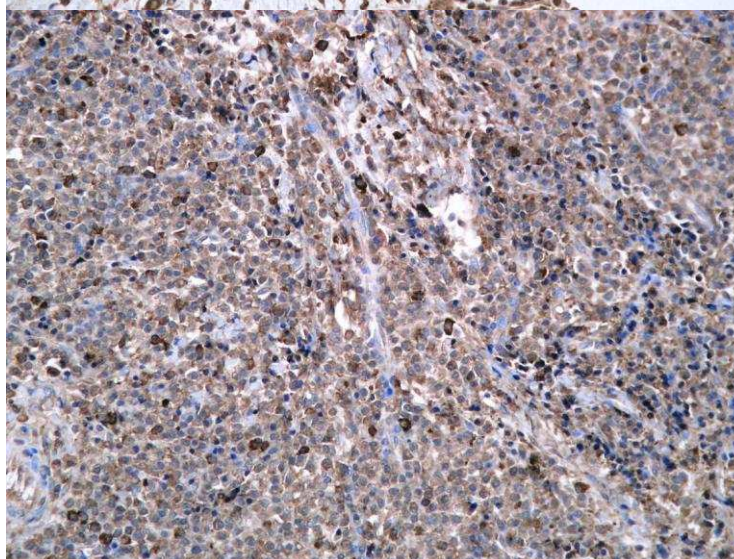
9.4 Wykaz tabel i rycin umieszczonych w tekście

Tabela I. Klasyfikacja torbieli nabłonkowych wg WHO z 1971 roku.....	19
Tabela II. Klasyfikacja torbieli nabłonkowych wg WHO z 1992 roku.....	20
Tabela III. Czynniki wpływające dodatnio na rozwój i aktywację osteoklastów.....	36
Tabela IV. Czynniki wpływające ujemnie na rozwój i aktywację osteoklastów.....	37
Tabela V. Rodzaj zmian okołowierchołkowych a płeć chorych.....	57
Tabela VI. Rodzaj zmian okołowierchołkowych a wiek chorych.....	58
Tabela VII. Częstość występowania zmian okołowierchołkowych w kościach szczęki i żuchwy.....	58
Tabela VIII. Wielkość zmian okołowierchołkowych.....	59
Tabela IX. Ekspresja RANKL w zmianach okołowierchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.....	62
Tabela X. Ekspresja RANKL a rozmiar zmian okołowierchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.....	62
Tabela XI. Ekspresja OPG w zmianach okołowierchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.....	64
Tabela XII. Ekspresja białka OPG a rozmiar zmian okołowierchołkowych w badaniu immunohistochemicznym.....	64
Rycina. 1. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel zapalna żuchwy z otoczką osteosklerotyczna.....	27
Rycina. 2. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel żuchwy okolicy kąta i ramienia żuchwy z zębem w jej świetle.....	28
Rycina 3. Badanie panoramiczne rtg szczęk. Torbiel zapalna szczęki obejmująca obszar od zęba 13 do 26, penetrująca do zatok szczękowych prawej i lewej.....	28
Rycina 4. Przykładowy immunoblot lizatów białkowych analizowanych	

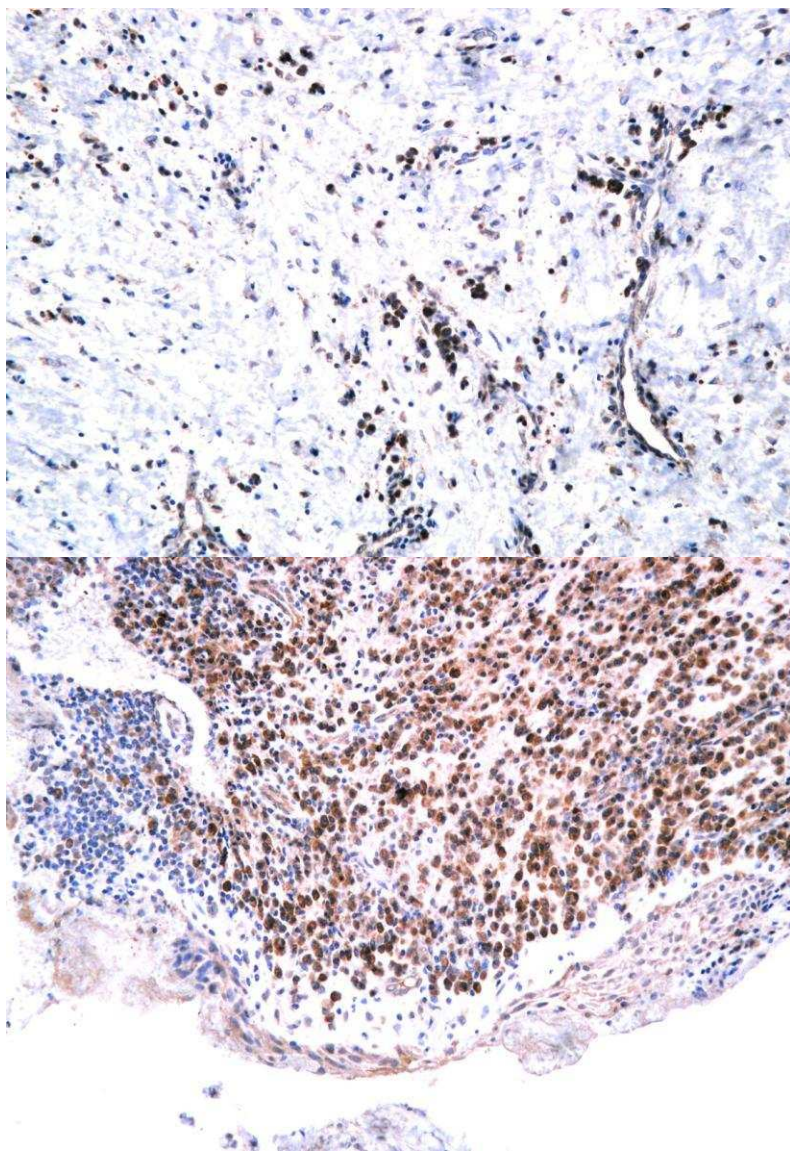
tkanek.....	65
Rycina 5. Poziom ekspresji RANKL w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.....	66
Rycina. 6. Poziom ekspresji OPG w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.....	67
Rycina 7. Poziom ekspresji RANKL, OPG i stosunek RANKL/OPG w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych grupy badanej.....	68
Rycina 8. Stosunek RANKL/OPG w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.....	69
Rycina 9. Poziom ekspresji IL-1 α w zmianach okołowierzchołkowych korzeni zębów.....	70
Rycina 10. Poziom ekspresji IL-1 α w ziarniniakach okołowierzchołkowych, torbielach zapalnych i torbielach zawiązkowych grupy badanej.....	70
Rycina 11. Korelacja pomiędzy stosunkiem RANKL/OPG a charakterem zmiany okołowierzchołkowej korzeni zębów.....	71
Rycina 12A. Korelacja między ilością białka RANKL i OPG.....	73
Rycina 12B. Korelacja pomiędzy ilością białka RANKL a ilością cytokiny IL-1 α	73
Rycina 12C. Korelacja pomiędzy ilością białka OPG a ilością cytokiny IL-1 α	73



Ryc. 13. RANKL x100,
torbiel zębopochodna



Ryc. 14. RANKL x200,
ziarniniak
okołowierzchołkowy



Ryc. 15. OPG x200,
ziarniniak
okołowierzchołkowy

Ryc. 16. OPG x100,
torbiel zębopochodna