

**ANNALES  
ACADEMIAE MEDICAE  
GEDANENSIS  
TOM XLIII  
2013  
SUPPLEMENT 8**



**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Anna Starzyńska**

**Ocena czynników różnicujących osteoklasty  
w nowotworach i torbielach zębopochodnych  
szczęki i żuchwy**

*Evaluation of osteoclasts differentiating factors  
in odontogenic neoplasms and cysts of jaws*

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Chirurgii  
Szczękowo-Twarzowej i Stomatologicznej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik: prof. dr hab. Adam Włodarkiewicz

**GDAŃSK 2013**

Wydano za zgodą  
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY  
EDITOR-IN-CHIEF  
Marek Grzybiak

HONOROWY REDAKTOR NACZELNY  
HONORARY EDITOR-IN-CHIEF  
Stefan Raszeja

KOMITET REDAKCYJNY  
EDITORIAL BOARD  
z-ca redaktora naczelnego – Adam Szarszewski  
sekretarz redakcji – Włodzimierz Kuta  
redaktor techniczny – Tadeusz Skowrya  
Tomasz Bączek, Zdzisław Bereznowski, Anna Grygorowicz, Andrzej Hellmann,  
Jerzy Kuczkowski, Krzysztof Narkiewicz, Michał Obuchowski,  
Zbigniew Kmiec, Julian Świerczyński, Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI  
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE  
Annales Academiae Medicae Gedanensis  
Zakład Anatomii Klinicznej  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland  
e-mail: [annales@gumed.edu.pl](mailto:annales@gumed.edu.pl)

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis  
są zamieszczane w bazie EMBASE  
Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis are covered  
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Gdański Uniwersytet Medyczny



Składam serdeczne podziękowania Panom:  
prof. dr. hab. Adamowi Włodarkiewiczowi  
prof. dr. hab. Wojciechowi Biernatowi  
prof. dr. hab. Tadeuszowi Pawelczykowi

Bardzo dziękuję wszystkim dzięki, którym powstanie  
tej pracy było możliwe



## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	9
1. WSTĘP.....	11
1.1. Guzy zębopochodne .....	11
1.1.1. Guzy łagodne .....	14
1.1.2. Guzy złośliwe.....	32
1.1.3. Inne guzy.....	38
1.2. Torbiele kości szczęki i żuchwy .....	38
1.3. Mechanizm procesu powstawania i resorpcji kości.....	43
2. CEL PRACY .....	48
3. MATERIAŁ I METODY .....	49
3.1. Pacjenci i materiał do badań.....	49
3.2. Metoda badań molekularnych .....	49
3.3. Metoda badań immunohistochemicznych .....	52
3.4. Analiza statystyczna .....	55
4. WYNIKI.....	57
4.1. Wyniki badań molekularnych.....	57
4.1.1. Charakterystyka badanej grupy poddanej analizie Western Blot.....	57
4.1.2. Ekspresja RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ na poziomie białka .....	60
4.1.3. Analiza czynnikowa chorych poddanych badaniu molekularnemu.....	61
4.1.4. Analiza ekspresji RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ oraz stosunku RANKL/OPG w szkliwiakach i rogowaciejąco- torbielowatych guzach zębopochodnych oraz w torbielach korzeniowych i zawiązkowych w porównaniu do grupy kontrolnej .....	62
4.1.5. Porównanie ekspresji RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ oraz stosunku RANKL/OPG w nowotworach zębopochodnych (szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych) oraz w torbielach zębopochodnych (korzeniowych i zawiązkowych).....	65
4.1.6. Analiza zależności pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ a wielkością zmiany.....	71
4.1.7. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ .....	71

---

4.2. Wyniki badań immunohistochemicznych ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 .....	75
4.2.1. Charakterystyka badanej grupy poddanej analizie immunohistochemicznej.....	75
4.2.2. Analiza materiału do badania immunohistochemicznego ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 .....	78
4.2.3. Analiza czynnikowa chorych poddanych badaniu immunohistochemicznemu.....	80
4.2.4. Analiza metodą półilościową H-score ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i w podścielisku badanych zmian chorobowych.....	80
4.2.5. Analiza metodą półilościową H-score ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków: litym, jednotorbielowatym i obwodowym.....	91
4.2.6. Analiza ekspresji RANKL i OPG w zależności od liczby RANKL- i OPG-dodatnich komórek w nabłonku i podścielisku zmiany (RANKL<OPG, RANKL=OPG i RANKL>OPG) .....	93
4.2.7. Analiza oceny poziomu RANKL, OPG i MMP-9 metodą półilościową według podziału na stopnie ekspresji (brak, słaba, średnia, silna).....	93
4.2.8. Analiza zależności pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i MMP-9 a wielkością zmiany.....	98
4.2.9. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i MMP-9 w całej badanej grupie .....	99
4.2.10. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i MMP-9 w torbielach korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach (wewnątrzgrupowe).....	109
5. DYSKUSJA .....	111
6. WNIOSKI .....	127
7. PIŚMIENNICTWO .....	128
8. STRESZCZENIE .....	153
9. SUMMARY .....	157

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

A	<i>ameloblastoma</i> / szkliwiak
A-S/M	<i>solid/multicystic ameloblastoma</i> / szkliwiak lity
A-D	<i>desmoplastic ameloblastoma</i> / szkliwiak desmoplastyczny
A-E/P	<i>extraosseous/peripheral ameloblastoma</i> / szkliwiak zewnątrzkości- ny/obwodowy
A-U	<i>unicystic ameloblastoma</i> / szkliwiak jednokomorowy
DC	<i>dentigerous cyst</i> / torbiel zawiązkowa
ECM	<i>extracellular matrix</i> / macierz zewnątrzkomórkowa
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> / kwas etylenodwuaminoczworoocowy
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> / czynniki wzrostu fibroblastów
IL	<i>interleukin</i> / interleukina
KCOT	<i>keratocystic odontogenic tumour</i> / rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny
MMP	<i>metalloproteinases</i> / metaloproteinazy
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> / obrazowanie metodą rezonansu magne- tycznego
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor <math>\kappa</math>B</i> / jądrowy czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B
OCIF	<i>osteoclastogenesis inhibitory factor</i> / czynnik hamujący osteoklastoge- nezę
OCPs	<i>osteoclast precursors</i> / precursory osteoklastów
ODF	<i>osteoclast differentiation factor</i> / czynnik różnicowania osteoklastów
OPG	<i>osteoprotegerin</i> / osteoprotegeryna
OPGL	<i>osteoprotegerin ligand</i> / ligand osteoprotegeryny
p	<i>p value</i> / poziom istotności
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / bufor fosforanowy
Q25	<i>lower quartile</i> / dolny kwartył
Q75	<i>upper quartile</i> / górny kwartył
r	współczynnik korelacji / <i>correlation coefficient</i>
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> / receptor aktywujący jądrowy czynnik NF $\kappa$ B
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B ligand</i> / ligand receptora akty- wującego jądrowy czynnik NF $\kappa$ B
RC	<i>radicular cyst</i> / torbiel korzeniowa
SD	<i>standard deviation</i> / odchylenie standardowe

TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> / transformujący czynnik wzrostu $\beta$
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i> / tkankowy inhibitor metaloproteinaz
TK	tomografia komputerowa / <i>computed tomography</i>
TNF	<i>tumour necrosis factor</i> / czynnik martwicy nowotworu
TNFR	<i>tumour necrosis factor receptor</i> / receptor czynnika martwicy nowotworu
TRANCE	<i>TNF-related activation induced cytokine</i> / cytokina aktywująca związana z TNF
WHO	<i>World Health Organization</i> / Światowa Organizacja Zdrowia

## 1. WSTĘP

### 1.1. Guzy zębopochodne

Nowotwory zębopochodne szczęki i żuchwy są rzadką i jednocześnie bardzo zróżnicowaną pod względem klinicznym i histologicznym grupą guzów wywodzących się z pozostałości nabłonkowych, ektomezenchymalnych lub mezenchymalnych aparatu zębowego. Mogą one jednak stanowić trudny problem diagnostyczny i terapeutyczny. Dotychczas nie ma jednolitej klasyfikacji tych guzów. Próby w reklasyfikacji tych zmian są nadal niezadawalające. W 2005 roku zrewidowano klasyfikację WHO z 1992 roku [119] tych guzów i opublikowano nową [18]. Według tego podziału guzy zębopochodne są zmianami pochodzącymi z elementów nabłonkowych, ektomezenchymalnych lub mezenchymalnych, które były lub są częścią aparatu zębotwórczego.

Klasyfikacja guzów zębopochodnych (WHO, 2005)

- **Guzy łagodne (*benign tumours*)**
  - *Guzy zawierające nabłonek zębotwórczy z dojrzałym, włóknistym podścieliskiem, bez zębopochodnej ektomezenchymy (odontogenic epithelium tumours with mature, fibrous stroma without odontogenic ectomesenchyme*
    - szkliwiak lity/wielokomorowy (*ameloblastoma, solid/multicystic type*)
    - szkliwiak zewnątrzkościowy/obwodowy (*ameloblastoma, extraosseous/peripheral type*)
    - szkliwiak desmoplastyczny (*ameloblastoma, desmoplastic type*)
    - szkliwiak jednokomorowy (*ameloblastoma, unicystic type*)
    - płaskonabłonkowy guz zębopochodny (*squamous odontogenic tumour*)
    - wapniejący nabłonkowy guz zębopochodny (*calcifying epithelial odontogenic tumour*)
    - pseudogruczołowy guz zębopochodny (*adenomatoid odontogenic tumour*)
    - rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (*keratocystic odontogenic tumour*)
  - *Guzy zawierające nabłonek zębotwórczy i zębopochodną ektomezenchymę, mogące tworzyć twarde struktury tkankowe (odontogenic epi-*

***thelium tumours with odontogenic ectomesenchyme, with or without hard tissue formation)***

włókniak szkliwiakowy (*ameloblastic fibroma*)

włókniakozębiniak szkliwiakowy (*ameloblastic fibrodentinoma*)

włókniakozębiak szkliwiakowy (*ameloblastic fibro-odontoma*)

zębiak (*odontoma*)

    zębiak zestawny (*odontoma, compound type*)

    zębiak złożony (*odontoma, complex type*)

zębiakoszkliwiak (*odontoameloblastoma*)

wapniejący torbielowaty guz zębopochodny (*calcifying cystic odontogenic tumour*)

zębinopochodny guz zawierający komórki cienie (*dentinogenic ghost cell tumour*)

- ***Guzy zawierające mezenchymę i/lub zębopochodną ektomezenchymę, mogące również zawierać nabłonek zębotwórczy (mesenchyme and/or odontogenic ectomesenchyme tumours with or without odontogenic epithelium)***

włókniak zębopochodny (*odontogenic fibroma*)

śluzak zębopochodny (*odontogenic myxoma/myxofibroma*)

kostniwiak (*cementoblastoma*)

- ***Zmiany związane z kością (bone-related lesion)***

włókniak kostniejący (*ossifying fibroma*)

dysplazja włóknista (*fibrous dysplasia*)

dysplazje kostne (*osseous dysplasias*)

wewnątrzkościenna zmiana olbrzymiokomórkowa (*central giant cell lesion*)

cherubizm/aniołkowatość (*cherubism*)

torbiel (jama) tętniakowata kości (*aneurysmal bone cyst/cavity*)

samotna torbiel (jama) kostna (*simple bone cyst*)

- ***Złośliwe zębopochodne guzy (malignant odontogenic tumours)***

- ***Raki zębopochodne (odontogenic carcinomas)***

szkliwiak złośliwy/przerzutujący (*metastasizing/malignant ameloblastoma*)

rak szkliwiakowy (*ameloblastic carcinoma*)

    typ pierwotny (*primary type*)

    typ wtórny wewnątrzkościenny (*secondary type intraosseous*)

    typ wtórny obwodowy (*secondary type peripheral*)



pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy (*primary intraosseous squamous cell carcinoma*)

typ lity (*solid type*)

powstający na podłożu rogowaciejaco-torbielowatego guza zębopochodnego (*derived from keratocystic odontogenic tumour*)

powstający na podłożu torbieli zębopochodnej (*primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from odontogenic cyst*)

jasnokomórkowy rak zębopochodny (*clear cell odontogenic carcinoma*)

zębopochodny rak zawierający komórki cienie (*ghost cell odontogenic carcinoma*)

– **Mięsaki zębopochodne (*odontogenic sarcomas*)**

włókniakomięsak szkliwiakowy (*ameloblastic fibrosarcoma*)

włókniakozębiniakomięsak szkliwiakowy i włókniakozębiakomięsak szkliwiakowy (*ameloblastic fibrodentinosarcoma and ameloblastic fibroodontosarcoma*)

• **Inne guzy (*other tumours*)**

melanotyczny neuroektodermalny guz okresu niemowlęcego (*melanotic neuroectodermal tumour of infancy*)

Guzy zębopochodne występują wyłącznie w żuchwie i szczęce, zarówno wewnątrzkościowo jak i obwodowo. Ich wzrost wiąże się prawie zawsze z resorpcją otaczającej kości. W większości są to guzy łagodne lub miejscowo złośliwe. Etiologia łagodnych i złośliwych guzów jest nieznana. Guzy zębopochodne powstają *de novo*, bez wyraźnego czynnika sprawczego. Mogą występować w różnym wieku. Objawy kliniczne tych guzów są niespecyficzne. Łagodne zębopochodne guzy wykazują wolny, ekspansywny wzrost bez lub z niewielkim bólem. W przeciwieństwie do nich, w nowotworach złośliwych ból jest pierwszym i najczęstszym objawem. Często towarzyszy temu deformacja. Radiologicznie zdjęcia zębowe wewnątrzustne są zwykle pierwszym sposobem stwierdzenia obecności zmiany rozwijającej się w kości. Zdjęcie pantomograficzne jest wymagane w diagnostyce tych guzów. Badania TK i MRI dostarczają danych zarówno o topografii jak i strukturze wewnętrznej zmiany oraz dostarczają cennych informacji o zakresie guza. Rozwojowe torbiele zębopochodne mogą być prekursorami niektórych zębopochodnych guzów i raka płaskonabłonkowego wewnątrzkościowego. Leczeniem z wyboru guzów zębopochodnych jest chirurgiczne usunięcie zmiany. Duże nadzieje wiąże się również z zastosowaniem

osteoprotegeryny [138]. Istnieją koncepcje kombinowanej terapii osteoprotegeryny z kalcytoniną, a także stosowania przeciwciał monoklonalnych dla RANKL. Daje to nadzieje na wykorzystanie denosumabu czy imatinibu jako skutecznego leku antyosteolitycznego w różnych schorzeniach kości, w tym w obrębie szczęki i żuchwy.

### **1.1.1. Guzy łagodne**

#### **Guzy zawierające nabłonek zębottwórczy z dojrzałym, włóknistym podścieliskiem, bez zębopochodnej ektomezenchymy**

**Szkliwiak** (*ameloblastoma*) jest łagodnym guzem występującym wyłącznie w obrębie szczęki i żuchwy. Stanowi 1% guzów jamy ustnej. Budowa histologiczna szkliwiaka jest charakterystyczna i cechuje się obecnością komórek walcowatych o odwróconej polaryzacji, które ułożone są palisadowo wzdłuż błony podstawnej. Komórki tego nowotworu przypominają ameloblasty i uważa się, iż się z nich wywodzą. Badania potwierdziły tę hipotezę. Komórki te są pochodzenia nabłonkowego i mogą wykazywać ekspresję amelogeniny, prekursora szkliwa [125, 227].

Wyróżnia się cztery łagodne typy szkliwiaka zgodnie z aktualnie obowiązującą klasyfikacją WHO z 2005 roku, które są traktowane jako odrębne guzy:

- lity (*solid, multicystic ameloblastoma*)
- zewnątrzkościowy/obwodowy (*extraosseus/peripheral ameloblastoma*)
- desmoplastyczny (*desmoplastic ameloblastoma*)
- jednokomorowy (*unicystic ameloblastoma*)

Zbadanie mechanizmu resorpcji kości w szkliwiaku pomoże w zrozumieniu biologii guza i wskaże kierunki leczenia klinicznego. Sandra i wsp. [209] wykazali, że naciekający wzrost guza wewnątrz kości wynika z faktu, że komórki szkliwiaka produkują czynnik RANKL i TNF. Indukuje to osteoklastogenezę i powoduje liżę kości oraz szerzenie się nowotworu. Postępowanie polegające na zablokowaniu tego receptora mogłoby zahamować osteoklastogenezę w otoczeniu guza i pośrednio wpłynąć na zahamowanie jego rozwoju.

W badaniu klinicznym najczęściej stwierdza się rozdęcie kości, często powodujące deformację twarzy, elastyczno-twarde wygórowanie pokryte niezmięcioną błoną śluzową, nieprzesuwalne względem otaczających tkanek i rucho-

mość sąsiadujących z guzem zębów. Radiologicznie przedstawia się jako jedno lub wielokomorowe przejaśnienie wyraźnie ograniczone, porównywane do obrazu plastra miodu lub baniek mydlanych. Na zdjęciu pantomograficznym można stwierdzić resorpcję korzeni zębów stykających się z guzem. Czasami szkliwiak związany jest z zatrzymanym zębem i wtedy w obrazie radiologicznym oprócz wyżej wymienionych zmian stwierdza się obecność zawiązka zęba (trzeciego trzonowca, kła). Nie stwierdzono zależności pomiędzy obrazem radiologicznym a postacią histologiczną szkliwiaka. Obraz radiologiczny wymaga różnicowania z torbielami i innymi guzami zębopochodnymi. Zdjęcie pantomograficzne pozwala wykryć szkliwiaka na długo przed pojawieniem się objawów klinicznych i może być pod tym względem traktowane jako badanie przesiewowe.

W leczeniu szkliwiaka metodą z wyboru jest leczenie chirurgiczne. Najczęściej stosuje się metody radykalne – resekcję odcinkową, ewentualnie resekcję brzeżną żuchwy z zachowaniem 1 cm marginesu makroskopowo niezmiennych tkanek. Sposób postępowania chirurgicznego w każdym przypadku powinien być ustalany indywidualnie. Szkliwiak występujący w obrębie szczęki, chociaż jest rzadszy, często stwarza więcej problemów niż szkliwiak żuchwy. Histologicznie jest identyczny i zachowuje się podobnie z wyjątkiem tego, że jego drogi infiltracji są liczniejsze i ma tendencję do rozprzestrzenia się poprzez tylną ścianę szczęki do dołu skrzydłowo-podniebiennego. Może naciekać podstawę czaszki, oczodół. Często leczeniem z wyboru jest maksilektomia lub maksilektomia poszerzona. Rekonstrukcję tego obszaru wykonuje się za pomocą przeszczepów skórnych i obturatora, chociaż w niektórych ośrodkach jest stosowana autogenna rekonstrukcja podniebienia z mikronaczyniowymi wolnymi płatami oraz docelowym umieszczeniem kostnych implantów. Długoterminowy okres obserwacji ma podstawowe znaczenie, ponieważ wznovy zdarzają się nawet po ponad dziesięciu latach po pierwszym leczeniu [21, 174].

**Szkliwiak lity** (*solid/multicystic ameloblastoma*) jest wolno rosnącym, miejscowo inwazyjnym, pochodzenia nabłonkowego zębopochodnym guzem szczęki lub żuchwy z wysokim stopniem wznów w przypadkach niecałkowitego usunięcia, ale prawie bez tendencji do przerzutów. Pomimo, iż rzadki, jest drugim najczęstszym zębopochodnym guzem, po zębiaku. Dokładna zachorowalność jest nieznana, ale odnotowuje się wyraźne różnice geograficzne i rasowe. Rozpoznanwany jest najczęściej od trzeciej do piątej dekady życia. Nie stwierdza się predylekcji do płci. Najczęściej występuje w żuchwie (około 80%), zwłaszcza w

okolicy zębów trzonowych i kąta żuchwy. Przyczyna powstawania szkliwiaka litego nie jest znana. Dysregulacja kilku genów w normalnym rozwoju zęba może grać rolę w jego histogenezie. Wyróżnia się pięć postaci histologicznych szkliwiaka litego: pęcherzykowy, splotowaty, akantotyczny, ziarnisto-komórkowy, bazaloidalny. Uważa się, iż typ histologiczny nie wpływa na leczenie lub prognozę. Kiedyś ziarnisto-komórkowa odmiana szkliwiaka uważana była za bardziej agresywną postać, ale obecnie tak nie jest. Guz ten rośnie powoli, ale ma bardzo dużą tendencję do wznów miejscowych. Udowodniono, iż po wyłuszczeniu zmiany w ciągu kilku lat dochodzi do wznowy w 60–80% przypadków, metoda ta nie jest zalecana nawet przy niewielkich zmianach. Uzasadnia to potrzebę bardziej agresywnego leczenia. Histologicznie wykazano obecność komórek guza kilka milimetrów od radiologicznej granicy zmiany, i to doprowadziło do ogólnej zasady, iż leczenie chirurgiczne powinno być wykonywane z zachowaniem 1 cm marginesu tkanek zdrowych. W przypadkach małych, pierwotnych zmian stosuje się resekcję brzeżną żuchwy lub resekcję odcinkową. Dla zmian większych (do 12 cm) zaleca się wykonanie hemimandibulektomii. Nerw żębodołowy dolny jest często poświęcany i jeżeli jest wskazanie może być zrekonstruowany przeszczepem nerwu. Opisano techniki resekcji odcinkowej żuchwy z zachowaniem nerwu, ale niesie to teoretyczne ryzyko wznowy wokół nerwu. W szczególności są wskazane szerokie marginesy, gdyż guz może powodować naciekanie zatoki szczękowej, jamy nosa, oczodołu i dołu podskroniowego. Zalecane są również pośrednie techniki jak agresywne miejscowe łyżeczkowanie z następczą krioterapią ciekłym azotem [207]. Związane są one z wysoką skutecznością i zasługują na rozważenie w planowaniu leczenia. Opracowano algorytmy zalecające łyżeczkowanie (*curettage*) i krioterapię zmian wewnątrzkościowych i resekcję w przypadku zmian z komponentą pozakostną. Leczenie powinno polegać na wycięciu z adekwatnym marginesem zdrowych tkanek. Wznowy występują do 50% w czasie pierwszych 5 lat. Zmiany w odcinku tylnym szczęki wykazują najgorsze rokowanie. Radioterapia nie powinna być stosowana w pierwszej kolejności leczenia szkliwiaka. Wskazana jest długoterminowa obserwacja, nawet do końca życia [40, 89, 90, 148, 183, 195, 208].

**Szklwiak obwodowy/zewnętrzny** (*peripheral/extraosseous ameloblastoma*) jest pozakostnym odpowiednikiem szkliwiaka litego występującym w tkankach miękkich. Stanowi 1,3–10% wszystkich szkliwiaków. Zakres wieku wynosi od 9 do 92 lat. 64% wszystkich przypadków występuje od piątej do

siódmej dekady życia. Średni wiek pacjentów wynosi u mężczyzn 53 lata, a u kobiet 51 lata i jest istotnie wyższy niż w przypadkach jego wewnątrzkościanego odpowiednika, który stwierdza się najczęściej w 37 roku życia. Częściej występuje u mężczyzn niż u kobiet (2:1). Guz ten występuje w 70% przypadków w żuchwie, głównie w trzonie i do przodu od otworu bródkowego. Klinicznie jest to niebolesny, twardy i egzofitycznie rosnący o gładkiej lub brodawkowatej powierzchni guz. Wewnątrzkościany rzadko rozszerzają się do tkanki dziąsła i zajmują nabłonek dziąsła, tworząc zmianę egzofityczną. W szkliwiaku obwodowym rzadko występuje zajęcie kości, chociaż obserwuje się jej resorpcję z ucisku. Może powstawać z pozostałości nabłonka zębopochodnego w obrębie dziąsłowej blaszki właściwej lub z warstwy podstawnej nabłonka dziąsła. Nie wykazuje inwazyjnego zachowania i leczeniem z wyboru jest wycięcie w granicach zdrowych tkanek wraz z okostną podłoża. Wznowy są rzadkie (16–19%). Zalecany jest długoterminowy okres obserwacji [179, 194, 195, 254].

**Szklwiak desmoplastyczny** (*desmoplastic ameloblastoma*) jest typem szkliwiaka ze specyficznymi cechami klinicznymi, radiologicznymi oraz histologicznymi. Szklwiak desmoplastyczny jest podobny do szkliwiaka litego pod względem rozkładu wieku oraz płci. Równie często występuje w szczęce i żuchwie, w przeciwieństwie do szkliwiaka litego, który częściej pojawia się w żuchwie. Szklwiak desmoplastyczny występuje głównie w przednim odcinku szczęki. Chorzy skarżą się najczęściej na bezbólową asymetrię twarzy. Średnica guza wynosi od 1,0 do 8,5 cm. Pozakostne warianty szkliwiaka desmoplastycznego nie były opisane. W obrazie radiologicznym najczęściej zauważa się nieregularną nieostro odgraniczoną „centkowaną” zmianę z miejscami przejaśnienia i zaciemnienia, sugerującą zmiany włóknisto-kostniejące. Może występować też resorpcja korzeni zębów. Przydatne jest badanie TK wysokiej rozdzielczości oraz MRI. W przeciwieństwie do szkliwiaka litego obserwuje się wyraźną ekspresję TGF- $\beta$ . Według obecnej wiedzy zaleca się zastosowanie takiego samego sposobu leczenia jak szkliwiaka litego [181, 195, 235].

**Szklwiak jednokomorowy** (*ameloblastoma unicystic type*) to typ szkliwiaka przypominający torbiel. W 1977 roku Robinson i Martinez po raz pierwszy opisali tę postać szkliwiaka. Według nich jest mniej agresywnym typem szkliwiaka. Średni wiek jest istotnie niższy niż w szkliwiaku litym. Nie wykazuje predylekcji do płci. Stanowi od 5 do 15% wszystkich szkliwiaków. Ponad 90% przypadków występuje w żuchwie, zwykle w bocznym odcinku trzonu, w okolicy kąta. Przypadki związane z niewyrzniętym zębem występują średnio w wieku

16 lat, w przeciwieństwie do 35 lat przy nieobecności niewyrzniętego zęba. Niektóre przypadki są bezobjawowe, czasem występuje niebolesne rozdęcie trzonu żuchwy. Do 80% jest związany z zatrzymanym trzecim dolnym zębem trzonowym. Zmiana przedstawia się radiologicznie jako dobrze otorbiona jednoogniskowa, związana z zatrzymanym zębem mądrości. Może wystąpić resorpcja korzenia. Szkliwiak jednokomorowy jest ekspansywną zmianą, która może zniszczyć znaczną część kości, ale zwykle nie zachowuje się jak szkliwiak lity i nie nacieka otaczającej kości. W większości przypadków szkliwiak jednokomorowy jest wyłuszczany z przedoperacyjnym rozpoznaniem klinicznym torbieli zawiązkowej i dopiero badanie patologiczne określa jego prawdziwą naturę. Badania wykazały także, iż wyłuszczenie guza jest nieodpowiednim leczeniem tych zmian. Zaleca się bardziej agresywne leczenie z obwodową osteotomią lub krioterapią ciekłym azotem lub z zastosowaniem obydwu tych metod. Zalecany jest długoterminowy okres obserwacji [184, 195, 201].

**Rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny** (*keratocystic odontogenic tumour*) jest to łagodny, jedno- lub wielotorbielowaty, zębopochodny guz rozwijający się wewnątrz kości. Najważniejszymi jego cechami są zdolność do miejscowej destrukcji, skłonność do nawrotów oraz tendencja do wieloogniskowości. Zębopochodna torbiel rogowaciejąca (*odontogenic keratocyst*), którą zaliczano wcześniej do torbieli nabłonkowych, została sklasyfikowana w 2005 roku jako rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny [18]. Decyzję o zakwalifikowaniu torbieli rogowaciejącej do nowotworów oparto na odkryciu mutacji genu PTCH [177]. Histogenetycznie rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny wywodzi się z nabłonka zębostwórczego z pozostałości blaszki zębowej i komórek warstwy podstawnej nabłonka błony śluzowej jamy ustnej. Guz ten charakteryzuje się cienką włóknistą torebką wyścieloną parakeratocytycznym nabłonkiem wielowarstwowym płaskim grubości 5–8 warstw, który nie tworzy wpukleń w otaczającą tkankę. Badania wykazały, że keratynocyty obecne w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym produkują cytokiny (głównie IL-1 $\alpha$ ), które odpowiadają za aktywność osteolityczną tej zmiany. Ponadto IL-1 $\alpha$  bierze udział w regulacji wytwarzania metaloproteinaz (głównie MMP-9), które mają związek z osteolizą kości w otoczeniu guza. Rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny często występuje w żuchwie, głównie w trzonie i kącie. W około 50% przypadków związany jest z niewyrzniętym zębem. Rzadziej jest zlokalizowany w szczęcie, ale wówczas przebieg choroby jest bardziej agresywny. Guz ten częstszy jest u mężczyzn niż u kobiet. Występuje od pierw-



szej do dziewiątej dekady życia, najczęściej w drugiej i trzeciej dekadzie życia. Może wystąpić jako część zespołu Gorlina-Goltza (*nevoid basal cell carcinoma syndrome*). Rozwija się przez dłuższy czas bezobjawowo, dlatego czasami jest wykrywany przypadkowo badaniem radiologicznym wykonanym z powodu leczenia stomatologicznego. Guzy te mogą osiągnąć znaczne rozmiary do momentu rozpoznania i dopiero wówczas pojawiają się dolegliwości bólowe i rozucie kości wyrostka zębodołowego. Może naciekać warstwę korową kości i otaczające struktury. W obrazie radiologicznym widać okrągłe lub owalne dobrze odgraniczone (często z otoczką sklerotyczną) jednokomorowe (czasami wielokomorowe) przejaśnienia. Przylegające zęby mogą być przemieszczone, ale resorpcja korzenia występuje rzadko. Badanie TK może być pomocne w wykryciu ewentualnego naciekania nowotworu w obrębie blaszki zbitej kości i ocenie zajęcia tkanek miękkich, szczególnie u pacjentów z zespołem Gorlina-Golza. Badanie MRI z kontrastem może dostarczyć bardziej szczegółowych informacji. Po zastosowanym leczeniu często występują wznowy i sięgają nawet 60%. Jest to spowodowane niecałkowitym usunięciem guza o cienkiej, delikatnej ścianie oraz czasem obecnością mikroguzów satelitarnych. Planowanie leczenia chirurgicznego wymaga szczególnego rozważenia w porównaniu z innymi guzami w obrębie jamy ustnej. Wskazane jest dokładne wyluszczenie guza lub marsupializacja. Niektórzy autorzy zalecają płukanie chemiczne jamy – *lavage* (np.: roztworem Carnoy'a), celem zniszczenia ewentualnych pozostałości komórek nowotworowych. Po chirurgicznym usunięciu guza można zastosować krioterapię (wprowadzenie ciekłego azotu do jamy kostnej). Szczególnie ważnym jest wycięcie błony śluzowej pokrywającej zębodoł, ponieważ zawiera ona często liczne mikroguzy satelitarne. Częściowe usunięcie kości wraz z jamą torbieli po wykonanym wyluszczeniu wydaje się zmniejszać liczbę nawrotów. Jest to potencjalnie agresywna zmiana. Pacjenci powinni być dokładnie kontrolowani po leczeniu z powodu częstej obecności mikroguzów i tendencji do wznów [187, 216].

**Płaskonabłonkowy guz zębopochodny** (*squamous odontogenic tumour*) jest rzadkim miejscowo naciekającym nowotworem składającym się z wysp dobrze zróżnicowanego nabłonka płaskiego osadzonego we włóknistym podścielisku. Po raz pierwszy był opisany w 1975 roku. W literaturze opisano mniej niż 50 przypadków. Występuje w przedziale wiekowym od drugiej do siódmej dekady życia. Średni wiek chorych wynosi około 40 lat. Nie ma predyspozycji związanej z płcią. Wydaje się występować w żuchwie i szczęce w równej czę-

stości. W przypadku szczęki częściej lokalizuje się w przednim odcinku, a w żuchwie najczęściej w odcinku dystalnym. Zmiany wieloogniskowe były opisane jako zmiany rodzinne. Etiologia płaskonabłonkowego guza zębopochodnego jest nieznana. Wydaje się pochodzić z pozostałości wysp nabłonkowych Malasseza w obrębie ozębnej. Guz jest często bezobjawowy, ale mogą wystąpić objawy kliniczne takie jak: rozchwianie zębów, miejscowy ból, obrzęk i zaczerwienienie dziąseł, naciek kości. Na zdjęciu radiologicznym charakterystyczne jest trójkątne lub półksiężycowatego kształtu przejaśnienie związane z korzeniami wyrżniętych lub wyrzynających się zębów. Leczenie chirurgiczne jest leczeniem z wyboru. Wznowy tego nowotworu są rzadkie.

**Wapniejący nabłonkowy guz zębopochodny** (*calcifying epithelial odontogenic tumour*) jest miejscowo inwazyjnym nabłonkowym nowotworem zębopochodnym, charakteryzującym się obecnością amyloidu, który może ulec wapnieniu. Stanowi około 1% wszystkich zębopochodnych guzów szczęki i żuchwy. Pindborg w 1955 roku wyodrębnił wapniejący nabłonkowy guz zębopochodny jako jednostkę chorobową. Nowotwór ten wywodzi się z pozostałości nabłonkowego kompleksu listewki zębowej. Jest to rzadki guz. W literaturze opisano mniej niż 200 przypadków w wieku od 13 do 80 lat (średnia wieku około 40 roku życia), bez różnic pod względem płci. Klinicznie wyróżnia się dwie postaci tego nowotworu: wewnątrzkościową (centralną) i zewnątrzkościową (obwodową). Większość przypadków jest wewnątrzkościowych. Około 6% powstaje w miejscach pozakostnych. Wewnątrzkościowe guzy dotyczą częściej żuchwy niż szczęki (stosunek 2:1), najczęściej występują w okolicy zębów przedtrzonowych i trzonowych. Obwodowe zmiany zwykle występują w przednim odcinku dziąsła dolnego. Rośnie powoli i bezobjawowo. Najczęściej jest przypadkowo wykrywany w rutynowych badaniach radiologicznych lub gdy osiągnie duże rozmiary. W obrazie radiologicznym jest widoczny jako dobrze ograniczone przejaśnienie, chociaż opisuje się też warianty niejednorodne, gdzie w obrębie guza obserwowano zwapnienia (obraz zamieci śnieżnej, wirów, rzadziej baniek mydlanych). Zmiany te mogą być jedno lub wieloogniskowe. W około połowie przypadków związany ze zmianą jest najczęściej zatrzymany dolny trzeci trzonowy ząb. Badanie TK i MRI dostarczają istotnych informacji w rozpoznaniu i leczeniu wapniejącego zębopochodnego guza nabłonkowego. Guz ten jest miejscowo agresywny. Stwierdzono od 14 do 20% nawrotów po miejscowej enukleacji. Odmiany złośliwe (zębopochodne raki) są opisywane rzadko. Wapniejący zębopochodny guz nabłonkowy wydaje się być mniej agresywny niż szkliwiak lity.



Leczeniem zalecanym jest szerokie miejscowe wycięcie z marginesem 5 do 10 mm, które w żuchwie może wymagać brzeżnej resekcji lub nawet odcinkowej resekcji kości i następnie rekonstrukcji. Wznovy występują w około 14% przypadków. Zalecany jest długoterminowy okres obserwacji [51, 109, 182, 248].

**Pseudogruzołowy guz zębopochodny** (*adenomatoid odontogenic tumour*) występuje jedynie w obrębie szczęki i żuchwy. Wywodzi się z pozostałości listewki zębowej. Częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn (1,9:1). Stanowi około 2–7% wszystkich zębopochodnych guzów. Występuje pomiędzy 5 a 30 rokiem życia. Jego najczęstszą lokalizacją jest przedni odcinek szczęki. Jest często wykrywany w związku z zatrzymanym zębem. Obraz radiologiczny stanowi gruszkowatego kształtu przejaśnienie z plamkowatymi nieprzejrzystymi ogniskami. Pseudogruzołowy guz zębopochodny czasami przemieszcza sąsiednie zęby, ale rzadko powoduje resorpcję ich korzeni. Rozpoznanie dokonuje się najczęściej przypadkowo w badaniu radiologicznym. Prosta enukleacja wydaje się być wystarczającym sposobem postępowania leczniczego. Obserwowane wznovy są niezwykle rzadkie. Guzy te wykazują przebieg kliniczny bardziej zbliżony do zmian typu hamartoma niż do nowotworów.

#### **Guzy zawierające nabłonek zębotwórczy i zębopochodną ektomezenchymę, mogące tworzyć twarde struktury tkankowe**

**Włókniak szkliwiakowy** (*ameloblastic fibroma*) jest rzadkim guzem zębopochodnym. Zawiera komponentę nowotworową, zarówno nabłonkową jak i mezenchymalną. Stanowi około 2% wszystkich zębopochodnych guzów szczęki i żuchwy. Występuje głównie w tylnej części żuchwy u młodych osób, często w drugiej lub trzeciej dekadzie życia. Jest niezmiernie rzadki po 40 roku życia. Średnia wieku wynosi 14,8 lat (zakres od 7 tygodni do 62 lat). Większość przypadków objawia się bezbolesną deformacją lub jest odkryta z powodu zaburzeń wyrzynania się zęba. Nie posiada predylekcji do płci. Związane z nim zęby zachowują żywotność. W obrazie radiologicznym widoczne jest dobrze odgraniczone jedno- lub wielokomorowe przejaśnienie. Zęby mogą być przemieszczone. Zmiana jest otorbiona i leczenie polega na jej wyłuszczeniu. Wznovy występują rzadko. Złośliwym odpowiednikiem włókniaka szkliwiakowego jest włókniakomięsak szkliwiakowy [146, 180].

**Włókniakozębiak szkliwiakowy** (*ameloblastic fibro-odontoma*) jest uważany za kombinację ameloblastycznego włókniaka z zębiakiem. Jest rzadszy niż włókniak szkliwiakowy. Średni wiek chorych wynosi od 8 do 12 lat. Nie ma predylekcji do płci lub do miejsca anatomicznego. Włókniakozębiak szkliwiakowy jest często bezobjawowy i może być wykryty z powodu utrudnionego wyrzynania się zęba. Radiologicznie wydaje się być złożony z przejaśnień/zacienień i powinien być odróżniony od innych podobnie wyglądających zmian jak kostniejący włókniak, wapniejący nabłonkowy guz zębopochodny, wapniejąca torbiel zębopochodna, zębiak oraz pseudogruzołowy guz zębopochodny. Jego leczenie polega na wyłuszczeniu. Rokowanie jest bardzo dobre. Bardzo rzadko opisywano wznowy.

**Zębiak** (*odontoma*) jest najczęstszym guzem zębopochodnym. Stanowi około 22% wszystkich guzów zębopochodnych i składa się z całkowicie zróżnicowanych, nieregularnie ułożonych dojrzałych tkanek zębowych. Zębiak jest łagodnym guzem mieszanym zawierającym elementy zarówno nabłonkowe jak i mezenchymalne. Jest anomalią rozwojową znajdowaną najczęściej na rutynowych radiogramach u dzieci i młodzieży. Może ujawnić się jako deformacja lub zmiana infekcyjna. Ponieważ zawiera dojrzałą tkankę zębową, często zastępuje brakujący ząb. Może występować w szczęce i w żuchwie, najczęściej w okolicy dolnych zębów trzonowych. Etiologia tego guza jest nieznana. Zębiak ma ograniczony potencjał wzrostu. Jednakże zwykle osiąga pewną wielkość i wówczas dopiero przestaje rosnąć. Leczeniem z wyboru jest wyłuszczenie guza. Wznowy nie występują. Wyróżnia się 2 typy zębiaka różniące się histologicznie oraz radiologicznie. Obydwie postaci mają takie same rokowanie oraz leczenie [93, 178].

**Zębiak zestawny** (*compound odontoma*) może występować w uzębionym obszarze szczęki i żuchwy, głównie w przednim odcinku. Zawiera liczne małe ząbki lub fragmenty zębopodobne wewnątrz zmian. Jest najczęstszą ze wszystkich zębopochodnych nowotworów i guzopodobnych zmian. Występuje dwukrotnie częściej niż zębiak złożony. W obrazie radiologicznym można często odróżnić małe ząbki otoczone strefą przejaśnienia. Sąsiadujące zęby mogą być przemieszczone, ale nigdy nie są resorbowane. Jest bezbolesną, powoli rosnącą zmianą. Kiedy jest w pełni dojrzały jego wzrost ustaje. Zwykle ma wielkość 1–2 cm średnicy, ale opisano również zmiany osiągające 6 cm. Rozdęcie wyrostka zębodołowego jest stwierdzane w mniej niż 10% przypadków. Często jest zlokalizowany blisko siecznej/zgryzowej części niewyrzyniętego zęba, przez co utrud-

nia jego wyrżnięcie. W niektórych przypadkach widoczne jest przemieszczenie wyrżniętych zębów. Niektóre występują w miejscu gdzie brakuje stałego zęba. Opisano przypadki mnogich zmian tego typu, które mogą być składową Zespołu Gardnera. Leczeniem z wyboru jest wycięcie guza. Rokowanie jest pomyślne. Wznowy nigdy nie opisano [4].

**Zębiak złożony** (*complex odontoma*) jest guzopodobną malformacją (hamartoma), w której szkliwo, zębina i czasem cement jest obecny i ułożony w sposób chaotyczny. Występuje w uzębionym odcinku szczęki i żuchwy, najczęściej w okolicy dolnych zębów trzonowych. Zębiak złożony jest bezbolesną wolno rosnącą zmianą. Po osiągnięciu przez niego dojrzałości, wzrost zatrzymuje się. Niekiedy może osiągnąć średnicę do 6 cm, najczęściej mierzy mniej niż 3 cm. Rozdęcie wyrostka zębodołowego może być widoczne. Sąsiadujące zęby mogą być przemieszczone i często występuje utrudnione wyrzynanie stałego zęba. W obrazie radiologicznym są to okrągłe lub owalne zacielenia otoczone przez strefę przejaśnienia, która może być szersza w rozwijającym się zębiaku złożonym. Leczeniem z wyboru jest wycięcie zmiany. Wznowy były opisywane jedynie w przypadkach niecałkowitego usunięcia guza.

**Zębiakoszkliwiak** (*odontoameloblastoma*) łączy cechy szkliwiaka z cechami zębiaka. Rzadkie występowanie tego nowotworu uniemożliwia ustalenie dokładnych danych epidemiologicznych. Najczęściej zębiakoszkliwiak jest rozpoznawany podczas pierwszych trzech dekad życia. Guz ten w równym stopniu dotyczy żuchwy oraz szczęki. Większość przypadków występuje do tyłu od kłów. Guz może się objawiać ekspansją kostną, resorpcją korzenia, przemieszczeniem zęba oraz czasem bólem. W obrazie radiologicznym jest to dobrze odgraniczone jedno- lub wielogniskowe przejaśnienie, w którym można znaleźć różne ilości zacielen. Większość przypadków jest związana z przemieszczeniem niewyrżniętych zębów. Zębiakoszkliwiak jest miejscowo agresywnym nowotworem podobnym w zachowaniu oraz rokowaniu do szkliwiaka [160].

**Wapniejący torbielowaty guz zębopochodny** (*calcifying cystic odontogenic tumour*) jest łagodnym torbielowatym nowotworem zębopochodnym. Cechuje się szkliwiako-podobnym nabłonkiem z obecnością komórek-cieni, które mogą ulec wapnieniu. Wapniejący torbielowaty guz zębopochodny może występować w postaci wewnątrz- lub zewnątrz-kostnej. Wiek chorych zawiera się w granicach od 5 do 92 lat, nie stwierdza się predylekcji do płci. Występuje z jednakową częstością w szczęce jak i w żuchwie, głównie w odcinku przednim. Zewnątrz-kostna postać jest guzem o barwie od różowej do czerwonej o gładkiej

powierzchni i średnicy do 4 cm. Pozostaje zwykle bezobjawowy. Wewnątrz-kostna postać objawia się jako bezbólowne rozdęcie wyrostka zębodołowego. Obraz radiologiczny zewnątrz-kostnej postaci może wykazać ubytek struktury kostnej o gładkich zarysach w rzucie guza oraz czasem przemieszczenie przylegających zębów. Obraz radiologiczny wewnątrz-kostnej postaci to najczęściej jednokomorowe dobrze ograniczone przejaśnienie. W około 50% widoczne są różne ilości zacienień o charakterze drobnych cętek. Resorpcja korzenia zęba zdarza się często. W jednej trzeciej przypadków związany jest z niewyrzniętym zębem. Leczeniem z wyboru jest wyluszczenie guza. Wznowy nie były opisane dla zewnątrz-kostnej postaci. Kilka wznów opisano dla postaci wewnątrz-kostnej.

**Zębinopochodny guz zawierający komórki cienie** (*dentinogenic ghost cell tumour*) jest to miejscowo inwazyjny nowotwór cechujący się ameloblastopodobnymi wyspami komórek nabłonkowych zatopionych w dojrzałym podścielisku łącznotkankowym. Obecne są liczne komórki cienie (*ghost cells*) i obfite złogi substancji zębinopodobnej. Poprzednio zębinopochodny guz zawierający komórki cienie był uważany za litą formę wapniejącej torbieli zębopochodnej [134]. Zębinopochodny guz zawierający komórki cienie występuje jako wewnątrz-kostny, rzadziej natomiast jako typ zewnątrz-kostny. Zakres wieku jest od drugiej do dziewiątej dekady. Jest nieznacznie częstszy u mężczyzn niż u kobiet. Może wystąpić w uzębionym obszarze zarówno w szczęce jak i żuchwie. Zewnątrz-kostny wariant wykazuje predylekcję do odcinka siecznego szczęki, podczas gdy wewnątrz-kostny najczęściej dotyczy regionu od kła do pierwszego zęba trzonowego. Guz jest zwykle bezobjawowy. Zewnątrz-kostny typ rozwija się najczęściej jako wolnorosnący, egzofityczny, uszypułowany, polipowaty guz na błonie śluzowej głównie przedniego odcinka wyrostka zębodołowego. Najczęściej osiąga rozmiary od 0,5 do 4,0 cm, ale najczęściej pomiędzy 0,5 a 1,0 cm. W około 20% przypadków w obrazie radiologicznym widać ubytek kości w rzucie guza. Zęby w dotkniętym obszarze mogą być przemieszczone. Wielkość wewnątrz-kostnego typu wynosi od 1 do więcej niż 10 cm średnicy. Zwykle nie daje objawów. Może zdarzyć się ekspansja kostna i w niektórych przypadkach resorpcja blaszki korowej kości z naciekaniami tkanek miękkich. Sąsiadujące zęby mogą być przemieszczone i rozchwiane. W obrazie radiologicznym widoczne jest przejaśnienie lub przejaśnienie/zacienienie zależne od ilości uwapnień. Granice są zwykle dobrze zaznaczone. W większości są to zmiany jednoogniskowe. Często występuje resorpcja korzeni sąsiadujących zębów. Guz ten może być związany z niewyrzniętym zębem. Wewnątrz-kostna postać może być

agresywna i dlatego zalecana jest szeroka resekcja, szczególnie jeśli guz jest radiologicznie słabo odgraniczony. Leczeniem z wyboru postaci zewnątrzkościowej jest wyłuszczenie. Wznowy nie były opisane, poza kilkoma wewnątrzkościowymi przypadkami. Stwierdzono nawet możliwość przemiany złośliwej [24].

**Guzy zawierające mezenchymę i/lub zębopochodną ektomezenchymę, mogące również zawierać nabłonek zębówotwórczy**

**Włókniak zębopochodny** (*odontogenic fibroma*) jest rzadkim nowotworem szczęki i żuchwy charakteryzujący się występowaniem różnej ilości nieaktywnie wyglądającego zębopochodnego nabłonka zatopionego w dojrzałym, włóknistym podścielisku. Wyróżnia się dwa typy włókniaka zębopochodnego: centralny i obwodowy. Występuje zarówno u mężczyzn jak i u kobiet we wszystkich grupach wiekowych. Znajdowany jest zarówno w żuchwie jak i w szczęce. Na świecie opisano mniej niż 100 przypadków tego guza. W obrazie radiologicznym przedstawia się jako dobrze odgraniczone przejaśnienie, często z otoczką sklerotyczną. Czasami zmiana jest wieloogniskowa i może naciekać blaszkę korową kości. Sąsiadujące zęby mogą być przemieszczone. Niektóre guzy są związane z koroną niewyrżniętego zęba. W obrębie guza czasami mogą być widoczne uwapnione masy o różnym kształcie i stopniu wysycenia. Włókniak zębopochodny przypomina więc wiele innych zębopochodnych zmian. Wyróżnia się dwie odmiany histologicznie: ubogonabłonkową i bogatonabłonkową. Klinicznie obie te podgrupy wydają się zachowywać podobnie. Leczeniem z wyboru jest wyłuszczenie guza z dokładnym wyłuszczeniem podłoża kostnego. Nawroty są rzadkie, chociaż były opisane bardziej agresywne odmiany [191].

**Śluzak zębopochodny** (*odontogenic myxoma*) jest wewnątrzkościowym nowotworem charakteryzującym się obecnością komórek gwiazdzistych i wrzecionowatych zatopionych w bogato kolagenowym śluzowym podścielisku. Guz ten stanowi od 15% do 20% guzów zębopochodnych. Jest trzecim co do częstości występowania guzem zębopochodnym (po zębiaku i szkliwiaku) z częstością występowania 0,07 nowych przypadków/milion osób/rok. Najczęściej występuje pomiędzy drugą a czwartą dekadą życia, częściej u kobiet niż u mężczyzn (stosunek mężczyzn do kobiet wynosi 1:1,5). Śluzak zębopochodny głównie występuje w żuchwie, najczęściej w okolicy zębów trzonowych. Zmiany w obrębie

szczęki mają tendencję do obliteracji zatok szczękowych jako cecha wczesna. Początkowo rozwija się bezobjawowo i może być wykryty przypadkowo na zdjęciu radiologicznym. W miarę wzrostu powoduje rozdęcie kości i asymetrię twarzy, przemieszczenie i rozchwianie sąsiadujących zębów. Często dochodzi do perforacji blaszki korowej i nacieku przyległych tkanek miękkich. W przypadku umiejscowienia w obrębie szczęki pierwszym objawem może być niedrożność i krwawienie z nosa. Radiologiczny obraz śluzaka jest podobny do szkliwiaka, ale widoczne są różnice w obrazie MRI. W obrazie radiologicznym stwierdza się jedno- lub wielogniskowe zwykle dobrze ograniczone przejaśnienia, czasem przypominające „bańki mydlane” lub „plaster miodu”. Mogą występować dość silnie wysyczone przegrody, które dają obraz „napiętego sznura” lub „naciągu rakiety tenisowej”. Często obserwuje się resorpcję korzeni i przemieszczenie zębów. Rzadko jest związany z niewyrzniętym zębem. Histologicznie zmiana zawiera mezenchymalną tkankę włóknistą, w której nie stwierdza się atypii. Ma mdły, bezbarwny obraz histologiczny. Zębopochodny nabłonek jest rzadko znajdowany wewnątrz zmiany i jego zębopochodne pochodzenie wynika z faktu, iż nie występuje nigdzie indziej w organizmie. Zakłada się, iż zębopochodny śluzak pochodzi z pierwotnej miazgi zębowej lub pierwotnej brodawki zębowej. Brodawka zębowa i mieszek zębowy osoby dorosłej histologicznie przypomina do śluzaka i błędy, dokonane histologicznie w różnicowaniu mieszka zębowego od śluzaka, mogą powodować zbędne leczenie niektórych przypadków błędnie rozpoznanych. Śluzak zębopochodny jest łagodną, ale miejscowo agresywną zmianą, która jest nieznacznie mniej agresywna niż szkliwiak lity. Prawidłowo powinien być leczony przez wyluszczenie i radykalne wyluszczenie podłoża lub obwodową osteotomię. W większych zmianach może powstać potrzeba odcinkowej resekcji żuchwy lub hemimaksilektomii. Jako leczenie uzupełniające do wyluszczenia guza stosuje się krioterapię ciekłym azotem lub płukanie roztworem Carnoy’a. Wznowy występują od 15% do 25%, ale pomimo tego rokowanie jest dobre. Wznowy zwykle następują po niecałkowitym usunięciu lub pozostawieniu zęba mającego kontakt z guzem. Zgon może nastąpić z powodu ekspansji na podstawę czaszki [14, 176, 224].

**Kostniwiak** (*cementoblastoma*) jest bardzo rzadkim guzem zębopochodnym. Stanowi mniej niż 1% wszystkich zębopochodnych guzów. Dotychczas opisano około stu przypadków. Wywodzi się z komórek ektomezenchymalnych przyzębia, głównie cementoblastów. Najczęściej występuje w drugiej i trzeciej dekadzie życia. Może wystąpić w przedziale wieku od 8 do 44 lat. Średni wiek



to około 20 lat. Nie ma preferencji do płci. Kostniwiak w większości przypadków występuje w żuchwie, szczególnie w okolicy zębów trzonowych. W badaniu klinicznym stwierdza się małego nasilenia nieciągły ból, rozdęcie wyrostka zębodołowego. Ząb sąsiadujący z guzem ma żywą miazgę. Rzadko występuje objaw Vincenta lub patologiczne złamanie żuchwy. W badaniu radiologicznym zmiana przedstawia się jako związane z korzeniem zęba zacinienie otoczone strefą przejaśnienia. Występuje resorpcja korzenia lub rozmycie struktury korzenia. Leczeniem z wyboru jest usunięcie zmiany oraz związanego z nią zęba. Konieczne jest dokładne wyłyżeczkowanie. W przypadku niecałkowitego usunięcia wraz ze związanym zębem wznowy są częste. Obwodowa osteotomia jest również zalecana jako leczenie zmian w przypadkach z możliwym wystąpieniem wznów [36].

### Zmiany związane z kością

**Włókniak kostniejący** (*ossifying fibroma*) jest łagodnym nowotworem charakteryzującym się zastąpieniem prawidłowej kości przez tkankę włóknistą i różnymi ilościami nowo utworzonej kości lub substancję podobną do cementu. W wyniku histologicznych podobieństw kostniejący włókniak i dysplazja włóknista klasyfikowane są wspólnie jako łagodne zmiany włóknisto-kostne. Rozpoznanie łagodnych włóknisto-kostnych zmian jest oparte na korelacji badań klinicznych, radiologicznych i histopatologicznych. We włókniaku kostniejącym wykryto zaburzenia chromosomalne [54, 80, 178], jednakże mechanizmy molekularne, leżące u podłoża rozwoju tego guza, pozostają nadal nieznane. Włókniak kostniejący jest to niebolesna, wolno rosnąca, ekspansywna zmiana w szczęce lub żuchwie. Chociaż włókniaki spotyka się w szerokim zakresie wiekowym, większość przypadków występuje w trzeciej i czwartej dekadzie życia. U kobiet występuje częściej niż u mężczyzn. Uważa się, iż włókniak kostniejący ograniczony jest do części twarzowej czaszki. Zmiana ta częściej występuje w żuchwie niż w szczęce, głównie w okolicy trzonu żuchwy. Były opisywane przypadki wieloogniskowego lub rodzinnego występowania włókniaka kostniejącego. W obrazie radiologicznym widoczne są dobrze odgraniczone przejaśnienia z wewnętrznymi zwapnieniami i otoczką sklerotyczną oraz przemieszczenie korzeni i rzadziej resorpcją korzeni. Histologicznie włókniaki te są utworzone z włóknistego podścieliska z beleczkami kostnymi lub z podobnych do cementu

kuleczek równomiernie rozłożonych w podścielisku. Leczenie polega na całkowitym wycięciu chirurgicznym. Guz ten daje się łatwo oddzielić od otaczającej kości. Wskaźnik wznów wynosi od mniej niż 1% do 63%. W świetle możliwości potencjalnych wznów niektórzy autorzy zalecają bardziej rozległe leczenie chirurgiczne dla bardziej agresywnych zmian obejmujących kości części twarzowej czaszki. Włókniak kostniejący nie wykazuje skłonności do infiltracji kości i stąd wymaga mniejszych marginesów niż 1 cm (wymaganych dla szkliwiaka, zębopochodnego śluzaka lub wapniejąco nabłonkowego zębopochodnego guza). Zęby z objawami resorpcji powinny być usunięte wraz z guzem [42, 205].

**Dysplazja włóknista** (*fibrous dysplasia*) jest genetycznie uwarunkowaną rzadką chorobą kości, która może dotyczyć jednej (postać monoostyczna) lub wielu kości (postać polioostyczna). Dysplazja włóknista, która występuje w kościach części twarzowej czaszki jest uważana jako postać monoostyczna czaszkowo-twarzowa. Dysplazja włóknista może być częścią zespołu McCune'a-Albrighta. Monoostyczna postać nie ma predylekcji do płci i grup etnicznych oraz jest sześć razy częstsza niż postać polioostyczna. Postać polioostyczna jest częstsza u kobiet (stosunek kobiet do mężczyzn wynosi 3:1). Dysplazja włóknista jest głównie rozpoznawana u dzieci i młodych dorosłych. Jednakże w 3% przypadków postaci polioostycznej, która występuje w zespole McCune'a-Albrighta, choroba może objawiać się u niemowląt. W kościach części twarzowej czaszki dysplazja włóknista występuje częściej w szczęce niż w żuchwie i może obejmować kość jarzmową oraz klinową. Długie kości, szczególnie kość udowa, następnie po niej kości czaszki oraz żebra są najczęściej dotkniętymi miejscami w szkielecie. W badaniu klinicznym stwierdza się niebolesną asymetrię twarzy, czasami nieregularne plamy koloru mlecznej kawy *cafe-au-lait*. Zajęcie szczęki i żuchwy może prowadzić do przemieszczenia zębów, zaburzeń zgryzowych i rzadko do resorpcji korzeni zębów. W przypadku dotyczącym zatok obocznych nosa może wystąpić niedrożność nosa. Zmiany rozciągające się do gałki ocznej mogą wywołać zaburzenia widzenia, podczas gdy zmiany w kościach skroniowych mogą spowodować utratę słuchu. Czasem dochodzi do bólu twarzy, bólów głowy lub drętwienia w obrębie twarzy. Dzieci wykazujące dysplazję włóknistą, w szczególności postać polioostyczną i nieregularne plamy *cafe-au-lait* powinny być dokładnie zbadane w kierunku zespołu McCune'a-Albrighta. U jednej trzeciej pacjentów z dysplazją włóknistą stwierdzono wzrost fosfatazy alkalicznej, nawet w przypadku nieobecności złamań i niezwiązanym z rozwojem choroby. W badaniu radiologicznym wyróżnia się trzy różne formy



dysplazji włóknistej zajmujące część twarzową czaszki: torbielowata (ubytki osteolityczne; zmiany wczesne), sklerotyczna (obraz matowego szkła; pośrednia faza) i mieszana (przejaśnienia i zaciemnienia; zmiany późne), stanowiące odpowiednio 21%, 23% i 56%. Wskazane jest wykonanie badania TK i MRI. W większości przypadków dysplazji włóknistej zmiany wydają się stabilizować z dojrzewaniem szkieletu. Chirurgiczna interwencja może być potrzebna z przyczyn funkcjonalnych lub ciężkich zniekształceń. Ryzyko transformacji złośliwej jest niewielkie. Bardzo rzadko opisywano rozwój mięsaka, głównie osteosarcoma [86, 141].

**Dysplazje kostne** (*osseous dysplasias*) są idiopatycznymi procesami zlokalizowanymi w uzębionym obszarze szczęki i żuchwy. Charakteryzują się zastąpieniem prawidłowej kości przez tkankę włóknistą i metaplastyczną kość. Uważa się, iż dysplazja kostna wywodzi się z aparatu zawieszeniowego zęba. Ma predylekcję do czarnoskórych kobiet w średnim wieku. Dysplazja kostna jest ograniczona do uzębionej części szczęki i żuchwy. Choroba ta występuje w różnych postaciach klinicznych, które noszą różne nazwy: okołowierzchołkowa dysplazja kostna (*periapical osseous dysplasia*), ogniskowa dysplazja kostna (*focal osseous dysplasia*), kwitnąca dysplazja kostna (*florid osseous dysplasia*) i rodzinny kostniwiak olbrzymi (*familial gigantiform cementoma*). W obrazie radiologicznym widoczna jest charakterystyczna ewolucja w zależności od rozwoju zmiany. W fazie początkowej występuje ubytek osteolityczny w okolicy okołowierzchołkowej zęba, w fazie pośredniej stwierdza się drobne uwapnione ogniska w rozrzedzonym ubytku osteolitycznym, w fazie końcowej jest dobrze ograniczone ognisko uwapnienia otoczone rąbką przejaśnienia („halo”). Różne postaci dysplazji włóknistej nie wymagają leczenia, chyba że wystąpią powikłania zapalne lub znaczna deformacja twarzy [37].

**Wewnątrzkostna zmiana olbrzymiokomórkowa** (*central giant cell lesion*) jest to zlokalizowana łagodna, ale czasem klinicznie agresywna osteolityczna, proliferacyjna zmiana składająca się z tkanki włóknistej z masami krwotocznymi i złogami hemosyderyny, obecnością osteoklasto-podobnych komórek olbrzymich i reaktywnym tworzeniem kości. Wewnątrzkostna zmiana olbrzymiokomórkowa występuje we wszystkich grupach wiekowych, jednakże większość przypadków jest rozpoznawana u pacjentów przed 30 rokiem życia z zapadalnością 1,1/milion populacji/rok. Kobiety chorują częściej niż mężczyźni (1,5–2:1). Wewnątrzkostna zmiana olbrzymiokomórkowa częściej występuje w żuchwie niż w szczęce, a szczególnie w okolicy bródki i zębów trzonowych. Zajęcie wy-

rostka kłykciowego lub zatoki szczękowej jest rzadkie. Wewnątrzkościowa zmiana olbrzymiokomórkowa zwykle rozwija się jednoogniskowo, chociaż opisywane są zmiany wieloogniskowe. Może ona być czasami związana z innymi chorobami, np.: nadczynność przynajmniej, cherubizm, zespół Noonana. Większość przypadków jest bezobjawowa. Jednakże czasami objawia się bólem lub parastezjami, rozstępem kości i rozchwianiem zębów. Może wystąpić niedrożność nosa. W obrazie radiologicznym widoczne są dobrze odgraniczone ubytki osteolityczne, często wieloogniskowe, ale nie otorbione. Wraz ze wzrostem wielkości, wieloogniskowość jest częstsza. Dodatkowo może występować resorpcja korzenia lub częściej przemieszczenie zęba. Charakterystyczne są faliste kostne przegrody pomiędzy zmianami. Okołowierzchołkowa lokalizacja może naśladować ziarniniaka okołowierzchołkowego. Leczeniem z wyboru jest wyłuszczenie zmiany. W przypadku wznów rozważa się bardziej ekspansywne leczenie chirurgiczne. W niektórych przypadkach można zastosować kalcytoninę (donosowo lub podskórnie). Udowodniono też skuteczność śródguzowego wstrzykiwania glikokortykosteroidów. Ostatnio z sukcesem zastosowano terapię interferonem alpha [1, 43, 44, 53, 57, 105, 126, 169, 171, 232].

**Cherubizm/aniolkowatość** (*cherubism*) jest genetyczną chorobą dziedziczącą się w sposób autosomalnie dominujący, która charakteryzuje się symetrycznym obustronnym rozstępem kości szczęk, prowadzącym do charakterystycznego wyrazu twarzy. Zmiana ta histologicznie jest nierozróżnialna od wewnątrzkościowej zmiany olbrzymiokomórkowej. Cherubizm występuje rodzinnie. Dotyczy 100% mężczyzn i około 70% kobiet. Występuje bardzo rzadko. Rozpoznanie jest postawione we wczesnym dzieciństwie (od 14 miesięcy do 4 lat) lub w łagodniejszych postaciach u starszych dzieci. Obustronne powiększenie szczęki może prowadzić do retrakcji skóry twarzy włączając dolne powieki, co daje odsłonięcie twardówki i typowy wygląd „patrzenia w niebo” (cherubiny na renesansowych obrazach). Innymi konsekwencjami są przemieszczenia zębów, opóźnienie wyrzynania się zębów, rozchwianie zębów, zaburzenia mowy i wzroku. Dodatkowo obserwowana jest limfadenopatia szyjna. W obrazie radiologicznym zajęte kości są poszerzone przez obustronne dobrze odgraniczone wieloogniskowe przejaśnienia z obrazem „bańki mydlanej”. Błazka korowa może być ścięczała i miejscowo nawet ulec perforacji. Z wiekiem początkowo włókniste tkanki są zastępowane przez struktury kostne co prowadzi do sklerozy. Rozpoznanie opiera się na objawach klinicznych (obustronne powiększenie szczęk) i typowych objawach radiologicznych na panoramicznych lub bocznych

zdjęciach lub skanach TK. Zmiany ustępują z czasem, szczególnie po ukończeniu wzrostu kości. Jedynie w przypadkach ciężkich zaburzeń funkcjonalnych powinno się wykonać zabieg chirurgiczny przed osiągnięciem dojrzałości [2, 44, 50].

**Torbiel (jama) tętniakowata kości** (*aneurysmal bone cyst/cavity*) jest ekspansywną osteolityczną zmianą często wieloogniskową z wypełnionymi krwią przestrzeniami oddzielonymi przez łącznotkankowe przegrody zawierające wielojądrowe komórki olbrzymie i przewlekłe nacieki zapalne. Torbiel tętniakowata kości najczęściej występuje u pacjentów w drugiej dekadzie życia. Głównie umiejscawia się w kościach długich, a bardzo rzadko (od 1 do 3%) w szczęcie i żuchwie. Może powstać pierwotnie lub wtórnie w innej zmianie kostnej, np.: zmianie olbrzymiokomórkowej lub dysplazji włóknistej. Obecnie uważa się, że związek z urazem jest nieprawdopodobny. Dane cytogenetyczne dostarczają dowodów, iż przynajmniej część torbieli tętniakowatych kości jest nowotworowych. Torbiel tętniakowata kości jest częściej znajdowana w żuchwie, głównie w trzonie, rzadziej w gałęzi. Wyrostek kłykciowy jest wyjątkowo zajęty. Objawia się rozdęciem kości, dolegliwościami bólowymi i parestezjami. Może występować przemieszczenie i rozchwianie zębów, jednak zachowują one żywą miazgę. Resorpcja korzeni może być obecna. Zajęcie oczodołu może prowadzić do wytrzeszczu i diplopii. Niedrożność nosa i krwawienie rzadko występuje. W obrazie radiologicznym widoczne są jednoogniskowe lub wieloogniskowe, dobrze odgraniczone przejaśnienia; do 10% mogą być obecne mieszane zaciemnienia/przejaśnienia. Może wystąpić perforacja blaszki korowej kości oraz ekspansja do tkanek miękkich. W badaniu TK (w poprzecznych przekrojach) widoczne są wewnętrzne przegrody. W badaniu MRI jest szczególnie widoczny poziom płynu wytwarzany przez sedymentację komórek krwi w jamach zmian. Torbiel tętniakowata kości może być leczona wyłyżeczkowaniem. Ekspansja w tkanki miękkie zwiększa ryzyko wznowy. Również stosowano z sukcesem embolizację [13, 20, 133, 161].

**Samotna torbiel (jama) kostna** (*simple bone cyst*) jest wewnątrzkościwą pseudotorbielą pozbawioną wyściółki nabłonkowej. Jest albo pusta lub wypełniona surowiczym lub krwistym płynem. Częściej jest obserwowana w drugiej dekadzie życia. Nie ma predylekcji do płci. Etiologia jest nieznana. Zmiana dotyczy prawie wyłącznie żuchwy, głównie w odcinku bródkowym. Opisano przypadki z obustronnymi zmianami. Wykrywana jest przypadkowo. Skargi to tkliwość lub łagodny ból. Przemieszczenie zębów lub złamania patologiczne są

bardzo rzadkie. Zęby sąsiadujące są zwykle żywe. Rzadko opisywany jest w wywiadzie uraz. W obrazie radiologicznym zwykle manifestuje się jako dobrze odgraniczone jednokomorowe przejaśnienie bez lub z jedynie nieznacznym ścięciem blaszki korowej. Samotna torbiel kostna może się wpuklać pomiędzy korzenie, co daje charakterystyczny obraz radiologiczny, że korzenie „wiszą” lub „pływają” w obrębie jamy guza. Resorpcja korzeni występuje wyjątkowo. Wewnątrzjamowy płyn może być uwidoczniiony na skanach T2 zależnych w badaniu MRI. W ostatecznym rozpoznaniu pomaga znalezienie pustej jamy podczas chirurgicznej eksploracji. Zwykle w ciągu roku po leczeniu chirurgicznym kość goi się całkowicie [69, 220].

### **1.1.2. Guzy złośliwe**

Większość złośliwych zębopochodnych guzów (*malignant odontogenic tumours*) jest uważana za odpowiedniki łagodnych guzów zębopochodnych z wyjątkiem pierwotnego wewnątrzkostnego raka płaskonabłonkowego. Złośliwe zębopochodne guzy są rzadkimi jednostkami, niektóre z nich są niezwykle rzadkie. Zębopochodne raki wydają się występować częściej u starszych osób. Etiologia złośliwych zębopochodnych guzów jest nieznana. Objawy kliniczne są identyczne do tych, które występują w przypadkach innych złośliwych guzów w części twarzowej czaszki. Często obserwuje się obrzęk, asymetrię twarzy, ból, krwawienie, owrzodzenie jamy ustnej, ruchomość zębów, parestezje lub objaw Vincenta. W przebiegu choroby wczesnie mogą występować przerzuty do węzłów chłonnych szyi oraz przerzuty odległe. W obrazie radiologicznym widoczna jest dużego stopnia destrukcja kości z nieregularnymi granicami. Z powodu małej liczby opublikowanych przypadków specyficzne protokoły leczenia lub zalecenia kliniczne nie są obecnie dostępne. Leczeniem z wyboru jest chirurgiczna resekcja zmiany z marginesem tkanek zdrowych. W niektórych przypadkach złośliwy zębopochodny guz wykazuje wzrost z istniejącego łagodnego odpowiednika. Rokowanie złośliwych zębopochodnych guzów jest złe.

Złośliwe szkliwiaki zostały podzielone na dwie różne zmiany: złośliwy szkliwiak i rak szkliwiakowy.

**Szkliwiak złośliwy** (*malignant/metastazing ameloblastoma*) jest rozpoznawany w przypadkach, gdy histologicznie pozornie łagodny szkliwiak daje odległe, przypominające zmianę pierwotną, przerzuty. Obydwie zmiany są mikro-

skopowo dobrze zróżnicowane i posiadają charakterystyczny histologiczny obraz szkliwiaka. Przypadki te są rozpoznawane retrospektywnie, w momencie znalezienia ich przerzutów. Przerzuty powstają po kilkukrotnych próbach leczenia chirurgicznego zmiany pierwotnej. Często są izolowanymi przerzutami do płuc. Mogą wystąpić również przerzuty do węzłów chłonnych. W niektórych przypadkach mogą być spowodowane aspiracją lub implantacją podczas zabiegu chirurgicznego [40, 263].

**Rak szkliwiakowy** (*ameloblastic carcinoma*) jest to guz, który wykazuje złośliwy histologiczny oraz morfologiczny obraz, niezależnie od obecności przerzutów w momencie ich wykrycia lub w czasie leczenia. Pierwotna lub przerzutowa zmiana charakteryzuje się histologicznymi cechami szkliwiaka i atypią komórkową charakterystyczną dla raka. Występują przerzuty do węzłów chłonnych szyi oraz odległe przerzuty do płuc, kości i mózgu. Częściej występuje w tylnym odcinku żuchwy niż w szczęcie. Uważa się, iż większość powstaje de novo. Jednakże opisano kilka przypadków pozornej przemiany z normalnego dobrze zróżnicowanego szkliwiaka w raka szkliwiakowego. Istnieją doniesienia histologicznie hybrydowych zmian wykazujących obszary normalnego szkliwiaka oraz miejsca raka szkliwiakowego. Sugeruje to, w niektórych przypadkach, potrzebę obszernego pobierania wycinków tkankowych. Leczeniem z wyboru pierwotnej zmiany jest wycięcie chirurgiczne z operacją węzłową na szyi. Nie udowodniono skuteczności radioterapii, ale chemioterapia może być stosowana z dobrym efektem [55, 84].

Wyróżnia się trzy typy raka szkliwiakowego:

- 1) typ pierwotny,
- 2) typ wtórny wewnątrzkościowy,
- 3) typ wtórny obwodowy.

**Rak szkliwiakowy – typ pierwotny** (*ameloblastic carcinoma – primary type*) jest rzadkim pierwotnym zębopochodnym nowotworem złośliwym, który łączy cechy histologiczne szkliwiaka z cytologiczną atypią. Stwierdza się nawet w przypadku braku przerzutów. Występowanie raka szkliwiakowego jest nieznanne, mniej niż 60 przypadków zostało opisanych. Około 2/3 przypadków występuje w żuchwie, głównie w tylnym odcinku. Opisano tylko 19 przypadków w szczęcie. Nie ma predylekcji do płci. W obrazie radiologicznym charakterystyczne jest nieregularnie, słabo odgraniczone przejaśnienie. Często jest obecne naciekanie warstwy korowej kości z perforacją i ekspansją do otaczających tkanek miękkich [64].

**Rak szkliwiakowy – typ wtórny wewnątrzkościowy** (*ameloblastic carcinoma – secondary type*) powstaje wewnątrz już istniejącego mikroskopowo potwierdzonego łagodnego szkliwiaka. Występuje bardzo rzadko. Większość przypadków powstaje u starszych osób w 7 dekadzie życia z klinicznie potwierdzonych długotrwałych szkliwiaków. Leczeniem z wyboru jest resekcja kości objętej zmianą z 2–3 cm marginesem tkanek zdrowych z operacją węzłową na szyi. Rokowanie jest niepewne.

**Rak szkliwiakowy – typ wtórny zewnętrznościowy** (*ameloblastic carcinoma – secondary type peripheral*) charakteryzuje się transformacją istniejącego obwodowego zewnętrznościowego szkliwiaka do złośliwego fenotypu komórkowego. Jest to bardzo rzadki nowotwór. Obraz kliniczny przypomina szkliwiaka obwodowego, jednak powierzchnia guza jest nierówna, nieregularna, jamista, pojawiają się wkłęsłości i owrzodzenia oraz przemieszczenie i rozchwianie sąsiadujących zębów. W obrazie radiologicznym widoczna jest resorpcja kości. Leczeniem z wyboru jest szerokie wycięcie z resekcją en bloc zajętych odcinków kości wraz z operacją węzłową na szyi. Wymagany jest długi okres obserwacji.

**Pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy** (*primary intraosseous squamous cell carcinoma*) jest bardzo rzadkim rakiem pochodzącym z pozostałości nabłonka zębopochodnego, który występuje tylko w obrębie wyrostka zębodołowego szczęki i żuchwy. Wyróżnia się trzy podkategorie:

- guz lity, który dokonuje inwazji przestrzeni szpikowej i indukuje resorpcję kostną,
- rak płaskonabłonkowy powstający z wyściółki zębopochodnej torbieli,
- rak płaskonabłonkowy w związku z innymi łagodnymi nabłonkowymi zębopochodnymi guzami.

Kiedy guz niszczy warstwę korową kości i przechodzi na błonę śluzową jamy ustnej może być trudno rozróżnić pomiędzy pierwotnym wewnątrzkościowym rakiem płaskonabłonkowym, a rakiem wywodzącym się z błony śluzowej jamy ustnej czy z błony śluzowej zatoki szczękowej.

**Pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy – typ lity** (*primary intraosseous squamous cell carcinoma – solid type*) powstaje pierwotnie wewnątrz kości szczęki czy żuchwy, bez łączności z błoną śluzową górnych dróg oddechowych i stąd nie jest wystawiony na działanie zewnętrznych czynników karcinogennych (palenia tytoniu, picia alkoholu). Pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy rozwija się z pozostałości nabłonka zębopochodnego, z wysp



Malasseza i z nabłonka szkliwotwórczego otaczającego zatrzymany ząb. Stosunek mężczyzn do kobiet wynosi 2:1, ze średnim wiekiem 55 lat, chociaż były przypadki obecności u niemowląt. Pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy jest częściej znajdowany w żuchwie niż w szczęcie, głównie w trzonie i w gałęzi. Przypadki w obrębie szczęki najczęściej występują w przednim odcinku. Większość przypadków jest bezobjawowa i są odkryte przypadkowo podczas rutynowego zdjęcia rentgenowskiego zębów. Mogą wystąpić dolegliwości bólowe, objaw Vincenta. W obrazie radiologicznym widoczne są ubytki osteolityczne o nieregularnych brzegach, bez otoczki osteosklerotycznej. Leczeniem z wyboru jest wycięcie kości w granicach tkanek niezmiennych z ewentualną operacją węzłową na szyi. Radioterapia może być stosowana jako leczenie uzupełniające lub paliatywne.

**Pierwotnie wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy powstający na podłożu rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego** (*primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from keratocystic odontogenic tumour*) jest to płaskonabłonkowy rak powstający wewnątrz kości żuchwy i szczęki bez łączności z błoną śluzową jamy ustnej w obecności rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego. Opisano 13 przypadków tego raka. Większość tych zmian obserwuje się u starszych pacjentów, 40 lat i powyżej, z przewagą mężczyzn. Nie są znane specyficzne czynniki predysponujące. Występuje częściej w żuchwie niż w szczęcie, szczególnie w trzonie i kącie. Zmiany wczesne rosną podstępnie, zwykle przedstawiając się jako łagodne zębopochodne torbiele i rozpoznanie raka postawione jest dopiero po badaniu mikroskopowym. Mogą wystąpić objawy kliniczne takie jak: ból, obrzęk, przemieszczenie i rozchwianie zębów, niegojące się zębodoły po ekstrakcji zęba i parestezje. Zmiany w zaawansowanym etapie choroby często niszczą blaszkę kostną i naciekają tkanki miękkie. Mogą być obecne przerzuty do węzłów chłonnych szyi. Radiologicznie zmiany wczesne często są nierozróżnialne od innych zębopochodnych torbieli. W niektórych przypadkach granice ubytku stają się nieregularne, postrzępione i coraz bardziej zatarte. Zmiany późne są oczywiście destrukcyjne. Następuje niszczenie warstwy korowej blaszki zbitej kości z naciekaniem tkanek miękkich. Wskazane jest badanie TK i MRI. Brak informacji wyklucza dokładne rokowanie [144].

**Pierwotnie wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy powstający na podłożu torbieli zębopochodnej** (*primary intraosseous squamous cell carcinoma derived from odontogenic cysts*) jest to płaskonabłonkowy rak powstający w

zuchwie i szczęce bez łączności z błoną śluzową jamy ustnej i w obecności zębopochodnej torbieli, innej niż rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny. Dobrze udokumentowano mniej niż 50 przypadków. Występuje głównie w 6 dekadzie życia. Stosunek mężczyzn do kobiet wynosi 2:1. Większość występuje w zuchwie z objawami bólu, parestezji lub drętwienia wargi dolnej. W obrazie radiologicznym może przypominać inne typy torbieli zębopochodnych. Pierwotny wewnątrzkościowy rak płaskonabłonkowy związany z wyrżniętym dolnym trzecim zębem trzonowym wydaje się mieć lepsze rokowanie, jednakże liczba opisanych przypadków jest mała.

**Jasnokomórkowy rak zębopochodny** (*clear cell odontogenic carcinoma*) w poprzedniej klasyfikacji WHO z 1992 roku był uważany za guz łagodny. Jest rzadkim, o nieznanym etiologii nowotworem. Z powodu swojego podobieństwa do innych zębopochodnych zmian oraz ze względu na swoje umiejscowienie w szczękach jest prawdopodobnie zębopochodnego pochodzenia. W czasie ostatnich 15 lat opisano jedynie 36 przypadków. Najczęściej występuje u kobiet, często powyżej 60 roku życia, głównie w zuchwie. Jasnokomórkowy rak zębopochodny zwykle powoduje asymetrię twarzy i rozchwianie zębów. W badaniu radiologicznym widać słabo odgraniczone nieregularnego kształtu przejaśnienie i resorpcję korzeni zębów. Jest nowotworem o miejscowej agresywności. Może dawać przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych i do płuc, jak również do kości, a progresja guza może nawet wywołać śmierć. Leczeniem z wyboru jest resekcja guza z marginesem tkanek zdrowych z operacją węzłową na szyi. Niektórzy autorzy zalecają następową radioterapię. Wieloletni okres obserwacji jest obowiązkowy [35].

**Zębopochodny rak zawierający komórki cienie** (*ghost cell odontogenic carcinoma*) jest złośliwym zębopochodnym nabłonkowym nowotworem z cechami wapniejącego torbielowatego zębopochodnego guza i/lub zębinopochodnego guza zawierającego komórki cienie. W literaturze do 2008 roku opisano tylko 31 przypadków. Ponad połowa z nich pochodziła z Azji. Guz występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet (w stosunku 2:1) i dotyczy pacjentów w wieku od 13 do 72 roku życia, najczęściej w czwartej dekadzie życia. Guz występuje częściej w szczęce niż w zuchwie (w stosunku 2:1), zarówno w przednim i tylnym odcinku, co odpowiada rozmieszczeniu wapniejących torbieli zębopochodnych. Zębopochodny rak zawierający komórki cienie jest guzem o różnorodnym obrazie klinicznym od wolno rosnącego, miejscowo inwazyjnego guza do wysoce agresywnego i szybko rosnącego nowotworu z miejscowymi wznosami i



przerzutami. W obrazie radiologicznym stwierdza się słabo ograniczony ubytek osteolityczny. Zęby sąsiadujące z guzem są przemieszczone i widoczna jest amputacja korzeni. Duże zmiany w szczęce często niszczą ścianę zatoki, naciekają okoliczne struktury. Rokowanie jest nieprzewidywalne. Przeżycie 5-letnie wynosi 73%. Wznowy są częste [11, 115, 140].

### **Mięsaki zębopochodne (*odontogenic sarcomas*)**

Zębopochodne mięsaki są rzadkie. Stanowią jedynie około 4% wszystkich zębopochodnych guzów.

**Włókniakomięsak szkliwiakowy (*ameloblastic fibrosarcoma*)** jest bardzo rzadkim zębopochodnym guzem z łagodną nabłonkową i złośliwą ektomezenchymalną komponentą. Jest złośliwym odpowiednikiem włókniaka szkliwiakowego. W literaturze opisano mniej niż 80 przypadków. Dwie trzecie objawia się klinicznie jako zmiany *de novo*. Natomiast pozostała jedna trzecia powstaje w istniejących już łagodnych zmianach zębopochodnych. Włókniakomięsak szkliwiakowy najczęściej występuje w żuchwie (78%). Opublikowano tylko jeden przypadek obwodowego włókniakomięsaka szkliwiakowego. Występuje w szerokim zakresie wieku (od 3 do 89 roku życia), najczęściej w 3 dekadzie życia. 63% opisanych przypadków wystąpiło u mężczyzn i 37% u kobiet. W obrazie radiologicznym stwierdza się jedno- lub wielokomorowy ubytek osteolityczny o niewyraźnych i nieregularnych granicach. Okoliczne zęby są przemieszczone i widoczna jest amputacja ich korzeni. W badaniu klinicznym stwierdza się dolegliwości bólowe i parestezje, rozdzęcie kości, przemieszczenie i rozchwianie zębów, następnie owrzodzenie błony śluzowej. Włókniakomięsak szkliwiakowy jest nowotworem miejscowo bardzo agresywnym z niezwykle niskim potencjałem odległych przerzutów. Z 64 przypadków tylko jeden miał przerzuty do węzłów śródpiersia i wątroby. Uważa się, iż rokowanie jest dobre. Leczeniem z wyboru jest szerokie chirurgiczne wycięcie, ewentualnie uzupełnione radioterapią i chemioterapią [38, 99].

**Włókniakozębiniakomięsak szkliwiakowy (*ameloblastic fibrodentinosarcoma*)** i **włókniakozębiakomięsak szkliwiakowy (*ameloblastic fibroodontosarcoma*)** występują wyjątkowo rzadko, a większość ich cech jest wspólna. Do 2009 roku opisano w literaturze jedynie 2 przypadki włókniakozębiniakomięsa-

ka szkliwiakowego i 15 przypadków włókniakozębiakomięśaka szkliwiakowego. Zakres wieku wynosi od 12 do 83 lat. Najczęściej występują w 3 dekadzie życia. Obraz kliniczny jest prawie taki sam jak we włókniakomięśaku szkliwiakowym. W obrazie radiologicznym widoczne jest niewyraźnie ograniczone, czasem wielogniskowe przejaśnienie oraz mogą być obecne uwapnione nieregularne struktury, odpowiadające komponentom tkanki twardej pochodzenia zębowego wchodzącym w skład nowotworu. Leczeniem z wyboru jest chirurgiczna resekcja w granicach tkanek zdrowych. Wydają się mieć lepsze rokowanie niż inne mięsaki szczęki. Jedyne jeden przypadek miał regionalne przerzuty. Miejscowe wznovy są częściej widziane [38, 106].

### 1.1.3. *Inne guzy*

**Melanotyczny neuroektodermalny guz okresu niemowlęcego** (*melanotic neuroectodermal tumour of infancy*) jest rzadkim guzem pochodzenia neuroektodermalnego. Najczęściej występuje u niemowląt. Nie ma przewagi płci. Większość opisanych przypadków dotyczyło umiejscowienia w kości szczęki (68,8%), czaszce (10,8%), żuchwie (5,8%) oraz w mózgu (4,3%). Zwykle guz ten ma charakter łagodny. Jednak obserwowano od 10 do 15% wznów zwłaszcza w przypadkach niecałkowitego usunięcia guza. Guz ten ma charakterystyczny obraz w TK lub MRI ze względu na zawartość melaniny [79, 87].

## 1.2. Torbiele kości szczęki i żuchwy

Torbiele są najczęstszą zmianą patologiczną rozwijającą się w kości szczęki i żuchwy. Torbiel jest to patologiczna jama, zawierająca treść o różnej spoiwości składzie (płynnej, półpłynnej lub gazowej), która nie powstaje przez kumulację ropy. Nazwa torbieli wywodzi się z greckiego słowa *kystis*, co oznacza jamę lub pęcherz zamknięty ze wszystkich stron. Ścianę torbieli tworzy mieszek składający się z zewnętrznej łącznotkankowej torebki, warstwy środkowej utworzonej z naczyń włosowatych i wewnętrznej, którą stanowi nabłonek wydzielniczy, wielowarstwowy płaski lub cylindryczny, produkujący płyn gromadzący się w torbieli. Jedyne samotne (proste) i tętniakowate torbiele kostne nie posiadają wyściółki lub zawartości płynnej. Cechą charakterystyczną torbieli jest ich bezob-

jawowy, powolny wzrost powodujący powstanie różnej wielkości ubytku kostnego, który może osiągnąć znaczne rozmiary. Torbiel w miarę powiększania się powoduje zniekształcenie kości i powstanie wygórowania zewnątrz- lub wewnątrzustnego, zależnie od umiejscowienia i kierunku wzrostu. Rozwój tych zmian może prowadzić do niszczenia struktury kostnej, deformacji twarzy i patologicznych złamań kości. Torbiele są zmianami nienowotworowymi, które niekiedy ulegają zezłośliwieniu. Nabłonek wielowarstwowy płaski wyścielający wewnątrz torebki torbieli rzadko może ulec transformacji nowotworowej. We wczesnej fazie powstawania torbieli obserwuje się aktywną proliferację komórek nabłonkowych Malasseza pod wpływem działania endotoksyn bakteryjnych pochodzących z martwej miazgi zęba. Wzrost ciśnienia wewnątrz torbieli (efekt hydrostatyczny) powoduje prawdopodobnie balonowate powiększanie się torbieli. Płyn torbieli jest najczęściej zapalnym płynem wysiękowym zawierającym wysokie stężenia białek (o dużej masie cząsteczkowej), cholesterolu, hemosyde-ryny, komórek immunokompetentnych, złuszczonej komórki nabłonkowej i włóknika (fibryny). Uważa się również, że czynniki kostno-resorpcyjne (takie jak prostaglandyny i inne) ułatwiają wzrost torbieli. Efektem działania tych czynników jest resorpcja otaczającej kości z niecałkowitą naprawą. Dotychczas opublikowano kilka klasyfikacji torbieli żuchwy i szczęki w oparciu o aspekty patogenetyczne, morfologiczne, topograficzne lub kliniczne. W 1992 Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) skorygowała podział histologiczny guzów zębopochodnych włączając do tej grupy torbiele kości szczęki i żuchwy [119]. Klasyfikacja ta oparta jest na pochodzeniu nabłonka torbieli.

Klasyfikacja torbieli nabłonkowych wg WHO z 1992 roku po wykluczeniu keratocysty w 2005 i zakwalifikowaniu jej do guzów zębopochodnych:

- **Rozwojowe (*developmental*)**

- **Zębopochodne (*odontogenic*)**

- torbiel dziąsłowa niemowląt/perły Epsteina (*gingival cyst of infants /Epstein pearls*)

- torbiel zawiązkowa (*dentigerous/follicular cyst*)

- torbiel nad wyrzynającym się zębem (*eruption cyst*)

- torbiel przyzębna boczna (*lateral periodontal cyst*)

- torbiel dziąsłowa dorosłych (*gingival cyst in adults*)

- torbiel gruczołowa zębopochodna/torbiel ślinowo-zębopochodna (*glandular odontogenic cyst/sialo-odontogenic cyst*)

- **Nieżębopochodne (*nonodontogenic*)**
  - torbiel przewodu nosowo-podniebiennego/kanału przysiecznego (*nasopalatine duct/incisive canal cyst*)
  - torbiel nosowo-wargowa/nosowo-zębodołowa (*nasolabial/nasoalveolar cyst*)
- **Zapalne (*inflammatory*)**
  - torbiel korzeniowa (*radicular cyst*)
    - okołowierzchołkowa lub boczna (*apical and lateral*)
    - reszkowa (*residual*)
  - torbiel przyzębna zapalna (*paradental inflammatory cyst*)

Najczęstszą nabłonkową torbielą jest torbiel korzeniowa (65–70%), następnie torbiel zawiązkowa (15–18%), torbiel przewodu nosowo podniebiennego (2–5%). Leczeniem z wyboru torbieli jest leczenie chirurgiczne. Polega ono na wyłuszczeniu torbieli. Możliwe są różne sposoby postępowania u pacjentów z torbielami. Na przykład w Stanach Zjednoczonych powszechną praktyką jest uzyskanie histologicznego rozpoznania przed przystąpieniem do leczenia. Jest to atrakcyjna opcja, ale może spowodować zakażenie torbieli i jej zapadnięcie się, co może utrudnić późniejsze usunięcie i przyczynić się do braku doszczętności zabiegu. W Europie (Wielkiej Brytanii, Niemczech i Polsce) jeśli nie ma objawów, które mogłyby sugerować związek ze złośliwością, zmiana jest usuwana w całości i wysyłana do badania histopatologicznego. Taki schemat postępowania jest zadowalający w większości przypadków, jeśli torbiel nie wykazuje miejscowej złośliwości. Zmiana może następnie być nieadekwatnie leczona. Kompromisem pomiędzy tymi dwoma opcjami jest aspiracja płynu z torbieli zarówno do cytologii jak i określenia zawartości białka. Cytologia jest często zawodna, ponieważ do badania aspirowany jest głównie płyn. Jednak poziom białka pozwala różnicować pomiędzy rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym i torbielą. Poziom białka powyżej 4% jest wysoce specyficzny dla rogowaciejąco torbielowatego guza zębopochodnego.

**Torbiel dziąsłowa niemowląt (perły Epsteina)** jest małą torbielą powstającą z pozostałości komórek nabłonka w błonie śluzowej wyrostka zębodołowego niemowląt. Są to białe lub żółte guzki występujące w błonie śluzowej wyrostka zębodołowego. Są obecne od urodzenia i znikają bez leczenia [119].

**Torbiel zawiązkowa** jest najczęstszą niezapalną, zębopochodną torbielą kości szczęki i żuchwy. Zawiera koronę zęba zatrzymanego począwszy od miejsca przejścia cementu w szkliwo. Rozwija się poprzez zatrzymanie płynu pomiędzy zredukowanym nabłonkiem narządu szkliwotwórczego a koroną lub pomiędzy warstwami zredukowanego nabłonka narządu szkliwotwórczego. Torbiel ta dotyczy głównie górnych kłów i dolnych trzecich zębów trzonowych. Często występuje w związku z urazem zęba, jest bezobjawowa, chyba, że wtórnie zainfekowana. Częściej występuje u mężczyzn niż u kobiet, od drugiej do czwartej dekady życia. Zazwyczaj rozwija się bezobjawowo i wykrywana jest wtedy przypadkowo na zdjęciu radiologicznym. Radiologicznie jest to jednokomorowa, dobrze odgraniczona, zawierająca koronę zatrzymanego zęba zmiana. Leczeniem z wyboru jest usunięcie zatrzymanego zęba łącznie z mieszkami torbieli [119, 216].

**Torbiel nad wyrzynającym się zębem** to rzadka odmiana torbieli zawiązkowej, która otacza koronę wyrzynającego się zęba. Częściowo zlokalizowana poza kością, pokryta jest nierogowaciejącym nabłonkiem warstwowym. Często powstaje u dzieci w związku z wyrzynaniem się mlecznego lub stałego zęba. W obrazie klinicznym objawia się jako niebieski obrzęk na wyrostku zębodołowym w miejscu wyrzynania się zęba. W obrazie radiologicznym tej torbieli stwierdza się, że związany z nią ząb leży bezpośrednio poniżej cienia tkanek miękkich i brak jest tkanki kostnej nad koroną wyrzynającego się zęba. Wiele torbieli spontanicznie pęka, dlatego trudno określić częstość ich występowania. Jednak wycięcie błony śluzowej jamy ustnej, która pokrywa torbiel, pozwoli zębowi wyróżnić się prawidłowo [16, 119].

**Torbiel boczna przyzębna** powstaje z pozostałości zębopochodnego nabłonka, ale nie jako wynik stymulacji zapalnej. Częściej występuje w okolicy zębów przedtrzonowych żuchwy. W obrazie radiologicznym widoczna jest jako okrągłe lub owalne przejaśnienie bocznie lub pomiędzy korzeniami zębów. Często jest rozpoznawana przypadkowo na zdjęciach radiologicznych. Leczeniem z wyboru jest enukleacja [119].

**Torbiel dziąsłowa dorosłych** jest rzadką torbielą o nieznanym etiologii występującą głównie w okolicy siekaczy i zębów przedtrzonowych żuchwy. Jest to dobrze ograniczona zmiana, zwykle o średnicy mniejszej niż 1 cm. Może nie dawać objawów radiologicznych lub małe powierzchowne resorpcje kostne. Zalecane jest leczenie chirurgiczne – wyluszczenie torbieli [16].

**Torbiel gruczołowa zębopochodna** (ślinowo-zębopochodna) jest rzadką torbielą powstającą w okolicy uzębionej szczęki i żuchwy. Światło torbieli jest wysłane nabłonkiem sześciennym lub walcowatym. W nabłonku lub w małych kryptach w ścianie torbieli występują komórki kubkowe. Torbiel ta może osiągnąć znaczący rozmiar, często przekraczający linię pośrodkową, i może nawrócić. Wskazany jest po leczeniu chirurgicznym (wyłuszczeniu torbieli) długi okres obserwacji [119, 194].

**Torbiel przewodu nosowo-podniebiennego** (kanału przysiecznego) powstaje z pozostałości nabłonka w kanale nosowo-podniebiennym. Występuje pośrodkowo w przednim odcinku szczęki. Najczęściej występuje od trzeciej do szóstej dekady życia. Dotyczy częściej mężczyzn niż kobiet (4:1). Radiologicznie jest to okrągłe, owalne lub podobne do kształtu serca przejaśnienie lokalizujące się pomiędzy centralnymi siekaczami lub wzdłuż przewodu nosowo-podniebiennego. Chorzy często zgłaszają dolegliwości bólowe i „słony” smak. Leczeniem z wyboru jest enukleacja z dojścia podniebiennego. Nawroty są rzadkie.

**Torbiel nosowo-wargowa** (nosowo-zębodołowa) jest rzadką torbielą usytuowaną na wyrostku zębodołowym blisko podstawy nozdrzy. Torbiel nosowo-wargowa jest torbielą tkanek miękkich, powstającą z pozostałości nabłonka dolnego końca przewodu nosowo-łzowego. Może spowodować resorpcję blaszki zewnętrznej kości szczęki. Głównie występuje pomiędzy czwartą a piątą dekadą życia, częściej u kobiet niż u mężczyzn. Zdjęcie radiologiczne może nie wykazać zmian patologicznych. Enukleacja jest terapią z wyboru. W większych zmianach jest często stosowany dostęp zewnątrzustny z wykonaniem cięcia w fałdzie nosowo-wargowym.

**Torbiel korzeniowa** (zapalna) powstaje z resztek nabłonka (komórek Malasseza) w ożębnej w wyniku zapalenia, zwykle w następstwie martwicy miazgi zęba. Najczęściej torbiel związana jest z wierzchołkiem korzenia zęba ze zgorzelinową miazgą, rzadziej rozwija się jako torbiel korzeniowa boczna na drodze naturalnego kanalika bocznego lub kanału powstałego po niewłaściwym leczeniu kanałowym. Torbiel korzeniowa jest najczęstszą torbielą. Głównie występuje w trzeciej i czwartej dekadzie życia, częściej u mężczyzn niż u kobiet. Najczęściej w okolicy siekaczy. W obrazie radiologicznym widoczny jest regularny ubytek cienia z otoczką osteosklerotyczną kształtu okrągłego (w szczęce) lub owalnego (w żuchwie). Jednakże zropiałe torbiele wykazują mniej wyraźne granice. Torbiel korzeniową różnicować należy w obrazie radiologicznym i mi-

kroskopowym z ziarniniakiem okołowierzchołkowym, jeśli zmiana jest mniejsza niż 5 mm. Mieszek torbieli jest zwykle gruby i łatwy do wyłuszczenia.

**Reszkowa torbiel korzeniowa** jest to torbiel, która pozostaje w szczęce lub żuchwie po usunięciu korzenia zęba (bez wyłyżeczkowania zmiany okołowierzchołkowej). Czasami może osiągnąć duże rozmiary. Na zdjęciu radiologicznym (zdjęciu pantomograficznym) mogą występować ogniskowe zwapnienia. Leczenie z wyboru jest wyłuszczenie mieszka torbieli.

**Zapalna torbiel przyzębna** powstaje na skutek procesu zapalnego toczącego się w kieszonce przyzębnej i występuje przy bocznej powierzchni szyjki zęba. Torbiel ta jest związana z częściowo wyrżniętym trzecim zębem trzonowym, który ma defekt szkliwa. Torbiel jest związana z pograniczem cementoszkliwnym, rzadko przekracza 2 cm średnicy. Leczenie jest chirurgiczne poprzez enukleację [119].

### 1.3. Mechanizm procesu powstawania i resorpcji kości

W zdrowej kości równowaga pomiędzy procesami jej powstawania i resorpcji (tzw. remodelingu) nie jest zakłócona, ponieważ aktywność osteoblastów i osteoklastów jest niezaburzona. W guzach zębopochodnych i torbielach w obrębie szczęki i żuchwy dochodzi do niszczenia kości. Proces ten jest spowodowany wzrostem aktywności i liczby osteoklastów. W 1997 roku trzy niezależne grupy badaczy odkryły, że prawidłowa przebudowa kości jest uwarunkowana dynamiczną równowagą w układzie cytokin wydzielanych głównie przez osteoblasty [246, 257]. Ten cytokinowy układ składa się z receptora aktywującego jądrocy czynnik NF- $\kappa$ B (RANK), ligandu RANK (RANKL) i osteoprotegeryny (OPG). Odkrycie układu RANKL/RANK/OPG przyczyniło się w największym stopniu do poznania biologii kości. Prawidłowe funkcjonowanie i dojrzewanie osteoklastów regulowane jest przez układ RANKL/RANK/OPG [243, 261]. Równowaga pomiędzy RANKL a OPG odgrywa zasadniczą rolę w utrzymaniu odpowiedniego bilansu kostnego. Osteoblasty regulują różnicowanie osteoklastów poprzez ekspresję RANKL, aktywującego rozwój osteoklastów oraz przez wydzielanie OPG, która blokuje działanie RANKL [32, 33, 128, 236, 241]. OPG jest rozpuszczalnym receptorem białkowym należącym do nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (TNFR) [256]. Nazwa wywodzi się z języka łacińskiego i powstała z połączenia słów: *os* – kość i *protegere* – chronić.



Można spotkać też w literaturze synonimy: OCIF, FDCR-1 i TR-1. OPG jest receptorem pułapką dla RANKL, który blokuje tworzenie osteoklastów przez hamowanie wiązania RANKL z RANK [132, 167, 221, 234]. Ponadto OPG skraca czas życia osteoklastów poprzez pobudzanie ich do apoptozy [258]. RANK jest glikoproteiną z nadrodziny receptorów TNF, będącą receptorem RANKL [97]. W literaturze są spotykane jego synonimy TRANCE-R i ODAR. RANKL jest ligandem RANK i białkiem należące do nadrodziny czynnika martwicy nowotworów (TNF). W literaturze można spotykać synonimy: TRANCE, TNFSF11, ODF, OPGL i CD254. Zgodnie z rekomendacją American Society for Bone and Mineral Research, RANKL, RANK i OPG są oficjalnymi nazwami tych białek [5]. U człowieka RANKL jest kodowany przez gen TNFSF11. RANKL jest czynnikiem aktywującym proces rozwoju i dojrzewania osteoklastów oraz blokuje ich apoptozę [12, 101]. RANK, RANKL i OPG są produkowane przez osteoblasty i komórki zrębu szpiku kostnego odpowiadające za różnicowanie osteoklastów, ale także przez aktywne limfocyty T, fibroblasty, limfocyty, monocyty, komórki śródbłonka naczyń, komórki dendrytyczne oraz komórki nowotworowe [225, 230]. Ekspresję RANK, RANKL i OPG stwierdzono w wielu tkankach, m.in. płucach, mięśniach szkieletowych, wątrobie, śledzionie, tarczycy, sercu, mózgu, węzłach chłonnych, nerkach., żołądku, jelitach, mózgu, rdzeniu kręgowym, tarczycy i kościach [31, 215]. Następujące czynniki IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, TNF- $\alpha$ , glikokortykosteroidy oraz parathormon i witamina D3 poprzez zwiększanie ekspresji RANKL wpływają na tworzenie się osteoklastów [28, 162]. Natomiast IL-4, IL-8 i TGF- $\beta$  hamują powstawanie i aktywność osteoklastów. Interleukina-1 $\alpha$  stymuluje resorpcję kości [121]. Efekt działania IL-1 $\alpha$  zależy od jej stężenia. Wysoka ilość IL-1 $\alpha$  stymuluje resorpcję kości wpływając na osteoklasty powodując wzrost aktywności RANKL. Natomiast niski poziom IL-1 $\alpha$  wpływa na proliferację osteoblastów i syntezę kolagenu. Ponadto IL-1 $\alpha$  podtrzymuje proces zapalny poprzez stymulację: komórek CD4+, chemotaksji neutrofilii oraz makrofagów w miejsce stanu zapalnego, wydzielania histaminy przez bazofile, produkcji prostaglandyn oraz zwiększa ekspresję molekuł adhezyjnych śródbłonka [17, 130].

Resorpcja kości, za pośrednictwem głównie osteoklastów, obejmuje usunięcie zarówno mineralnych jak i organicznych składników macierzy kostnej. Degradacja organicznej macierzy w kości jest głównie wywołana przez metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) [63, 229, 245]. MMP to proteazy posiadające zdolność do degradacji komponentów macierzy zewnątrzkomórko-



wej i błony podstawnej [39, 193] takich jak: kolageny, żelatyny, fibronektynę, tenascynę i lamininę w fizjologicznym pH [25]. MMP wraz z trzema innymi rodzinami białek – astacynami, adamalizinami i serralizynami, należą do nadrodziny endoproteinaz zwanych metzincynami, które w miejscu katalitycznym enzymu mają jon cynku. Obecnie znanych jest ponad 20 typów MMP i są one klasyfikowane na podstawie swoistości substratowej i różnic w strukturze czwartorzędowej łańcucha białkowego na podrodziny: kolagenazy (MMP-1, -8 i -13), żelatynazy (MMP-2 i -9), stromielizyny (MMP-3, -10 i -11), matrylizyny (MMP-7, -26), błonowe MMP (MMP-14, -15, -16, -17, -24 i -25) oraz inne MMP (MMP-12, -19, -20 i inne) [165].

Numeracja MMP rozpoczyna się od 1, a kończy na 28, nie obejmuje jednak numerów 4, 5, 6, 18, 22, ponieważ różne zespoły badawcze w tym samym czasie odkryły te same enzymy.

W warunkach fizjologicznych, enzymy te grają główne role w regulacji macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) podczas rozwoju embrionalnego i remodelingu tkankowego [48, 255]. W patologicznych warunkach uczestniczą one w destrukcji macierzy zewnątrzkomórkowej związanej z procesami zapalnymi tkanki łącznej jak reumatoidalne zapalenie stawów i choroba przyzębia [143], jak również w destrukcji ECM związanej z inwazją i przerzutami guza [136]. MMP są enzymami odgrywającymi ważne role w inwazji guza i tworzeniu przerzutów [233]. W reumatoidalnym zapaleniu stawów [173], chorobach przyzębia [120] oraz w inwazji guza [73, 136] istnieje nierównowaga pomiędzy MMP a tkankowymi inhibitorami metaloproteinaz (TIMP).

Wzrost ekspresji MMP w rakach piersi, trzustki, prostaty i płuca związany jest z większą inwazyjnością choroby i szybszym powstawaniem przerzutów odległych. Komórki nowotworowe mogą produkować MMP lub pobudzać do ich wytwarzania prawidłowe komórki organizmu takie jak: makrofagi, leukocyty i fibroblasty [113]. Komórki nowotworowe wykorzystują proteazy tkankowe do tworzenia nacieku nowotworowego oraz do migracji podczas tworzenia przerzutów [46, 100, 159, 163]. MMP biorą udział w resorpcji kości ułatwiając migrację osteoklastów w kierunku powierzchni kości poprzez macierz [102]. Wzmocniona miejscowa ekspresja MMP jest uważana za nowy i ważny czynnik prognostyczny, mogący wpłynąć na wdrożenie leczenia uzupełniającego. Ostatnio opisano korelację pomiędzy MMP a wskaźnikiem przeżycia w przypadkach raka jamy ustnej [47, 259]. W literaturze stwierdzana jest skuteczność związków chelato-

wych – batimastatu, marimastatu oraz antybiotyków tetracyklinowych w wiązaniu atomów cynku i blokowaniu miejsca aktywnego MMP.

Spośród MMP, MMP-9 jest prawdopodobnie najważniejszą proteinazą zaangażowaną w resorpcję kości, ponieważ osteoklasty posiadają bardzo wysoki poziom ekspresji tego enzymu [6]. Wykazano, że MMP-9 (żelatynaza B) trawi enzymatycznie żelatynę oraz kolagen typu IV i V, główny składnik błony podstawnej. Nasilenie ekspresji MMP-9 powoduje degradację tkanki kostnej i sprzyja agresywnemu wzrostowi zmian patologicznych, także guzów zębopochodnych.

Dużym sukcesem okazała się specyficzna blokada aktywności enzymatycznych MMP-9. Blokowanie syntezy MMP-9 przez antysensowne oligonukleotydy dla mRNA genu MMP-9 silnie hamuje migrację osteoklastów oraz resorpcję kostną. Ishibashi i wsp. [102] wygenerowali specyficzne antysensowne oligonukleotydy, które były tak zaprojektowane, aby zminimalizować możliwość krzyżowej hybrydyzacji z RNA innych genów. Wykazali, że MMP-9 antysensowne oligonukleotydy hamowały osteolizę kości. Uzyskane wyniki sugerują, że MMP-9 jest zaangażowana w proces resorpcji kości wywołanej przez osteoklasty poprzez ułatwienie migracji osteoklastów przez bogatobiałkową macierz. Specyficzne inhibitory MMP-9 mogłyby służyć jako obiecujący czynnik terapeutyczny w leczeniu chorób kości.

Odkrycie układu RANK/RANKL/OPG spowodowało rozwój intensywnych badań mających na celu stworzenie nowego leku do leczenia chorób przebiegających z osteolizą kości [15, 29, 65, 92, 116, 237, 238, 244, 247]. Doprowadziło to do powstania leków działających specyficznie na układ RANKL/OPG/RANK. Stworzono ludzkie monoklonalne przeciwciała (IgG2) specyficzne dla RANKL [23, 117, 147, 152]. Działa ono jak egzogenna OPG i powoduje utratę zdolności wiązania się RANKL z RANK. W wyniku czego następuje blokowanie rozwoju, aktywacji oraz przetrwania osteoklastów [156, 200]. Przeciwciała to występuje pod nazwą leku denosumab [45, 127]. Po pojedynczej podskórnej iniekcji OPG obserwowano utrzymujące się obniżenie resorpcji kostnej. Badano skuteczność zastosowania w pomenopauzalnej osteoporozie [22], u pacjentów cierpiących na szpiczaka mnogiego oraz w przypadkach wystąpienia przerzutów do kości [8, 19, 251]. Potwierdzono wysoką skuteczność blokady osi RANK/RANKL w zapobieganiu osteolizy wywołanej przez guza. Działanie to może zahamować wzrost guza oraz poprawić przeżycie. U większości pacjentów niezależnie od typu guza po zastosowaniu denosumabu

markery resorpcji kości obniżają się około 90% [71]. Poznanie ekspresji RANK w różnych patologiach kostnych, w tym guzach zębopochodnych w obrębie szczęki i żuchwy może być przydatne do przewidywania „dobrej odpowiedzi” na leczenie anty-RANKL. Umożliwi to bardziej indywidualne leczenie chorób w obrębie szczęki i żuchwy przebiegających z osteolizą kości.

Tkanka kostna masywnie przyciąga komórki guza, gdzie znajdują one przyjazne środowisko do utrzymania komórki pnia w stanie uśpienia oraz gdzie mają płodny grunt do swojego rozwoju. To „fatalne przyciąganie” związane ze specyficzną kostną niszą wywołało wiele innowacji terapeutycznych ukierunkowanych na komórki guza oraz na ich środowisko [252].

Pomimo licznych badań [135, 217, 231] nie wyjaśniono całkowicie mechanizmu powstawania i rozwoju guzów zębopochodnych oraz torbieli w obrębie szczęki i żuchwy. Uważa się, iż tworzenie się guzów zębopochodnych jest związane z proliferacją pozostałości nabłonka zębotwórczego, które są aktywowane przez uwolnienie cytokin i czynników wzrostu [217, 231]. Procesy, które wywołują powstanie nowotworów zębopochodnych i torbieli oraz resorpcję otaczającej kości są wciąż obiektem badań [74, 135]. Zbadanie mechanizmu resorpcji kości w szkliwiaku pomoże w zrozumieniu biologii guza i wskaże kierunki leczenia klinicznego. Mając to na uwadze podjęto badania, które pozwoliłyby wyjaśnić rolę układu RANKL/RANK/OPG oraz MMP-9 w różnych guzach zębopochodnych u chorych leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy było ustalenie zależności pomiędzy miejscową ekspresją cytokin RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$ , MMP-9 a niszczeniem kości w nowotworach i torbielach zębopochodnych szczęki i zuchwy.

Cele pracy szczegółowe:

1. Ocena ekspresji ligandu receptora aktywatora czynnika jądrowego (RANKL) i jego inhibitora osteoprotegeryny (OPG) oraz interleukiny-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) i metaloproteinazy (MMP-9) w guzach zębopochodnych (szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych) i w torbielach zębopochodnych (korzeniowych i zawiązkowych) w obrębie szczęki i zuchwy w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Wykazanie obecności oraz lokalizacji tkankowej RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  oraz MMP-9 w guzach i torbielach zębopochodnych.
3. Wykazanie zależności pomiędzy aktywnością układu RANKL/RANK/OPG oraz MMP-9 a wielkością ubytków w kościach szczęki i zuchwy u chorych z nowotworami i torbielami zębopochodnymi.
4. Wykazanie związku pomiędzy ekspresją RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i MMP-9 w nowotworach i torbielach zębopochodnych szczęki i zuchwy.
5. Ocena przydatności klinicznej badań dotyczących aktywności szlaku RANKL/RANK/OPG oraz MMP-9.
6. Zbadanie mechanizmów resorpcji kości w szkliwiaku, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym oraz torbieli korzeniowej i zawiązkowej.
7. Ocena roli układu RANKL/RANK/OPG i MMP-9 w progresji szkliwiaków, rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych i torbieli korzeniowych.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Pacjenci i materiał do badań

Materiał kliniczny stanowiła grupa 135 chorych leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej GUMed w okresie od 1.01.2000 r. do 31.12.2012 r. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Badanych chorych poinformowano o założeniach i rodzaju badań. Pacjenci pisemnie wyrazili zgodę na wykorzystanie pobranego materiału pooperacyjnego do przeprowadzenia badań histologicznych oraz molekularnych. Materiał do badań pobrano od 135 pacjentów (74 mężczyzn i 61 kobiet) w wieku od 9 do 89 lat (średnia wieku 47 lat). Podczas zabiegów wykonywanych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej GUMed w znieczuleniu ogólnym lub miejscowym uzyskano następujące typy zmian: szkliwiaki (n=23), rogowaciejąco-torbielowate guzy zębopochodne (n=32), torbiele korzeniowe (n=58), torbiele zawiązkowe (n=9) oraz mieszkki zębowe (n=13). Łącznie pobrano 135 zmian zębopochodnych w obrębie szczęki i żuchwy.

Próbki podzielono na dwie części. Jedna 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 krioprobówce, zamrożono w ciekłym azocie (-195,8°C) i umieszczono w zamrażarce w temperaturze -80°C do czasu wykonania badań molekularnych.

Badania histopatologiczne (n=135) oraz immunohistochemiczne (n=82) przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii GUMed (kierownik: prof. dr hab. Wojciech Biernat), natomiast badania molekularne (n=86) wykonano w Zakładzie Medycyny Molekularnej GUMed (kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Pawełczyk).

#### 3.2. Metoda badań molekularnych

##### **Bufory i odczynniki:**

Do przeprowadzenia badań Western Blot użyto następujących buforów i odczynników:

Bufor obciążający (BOB) 4 x stężony (40 ml) – (1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 4 ml 20% SDS; 460 mg DTT; 4 ml gliceryny; 1,5 mg bromophenol blue);

Bufor SDS – PAGE - (25 mM Tris; 250 mM glicyna; 0,1% SDS; H<sub>2</sub>O do końcowej objętości);

Bufor TBS pH 7,4 (10×stężony – 1000 ml) - (30 g Tris; 80 g NaCl; 2 g KCl; H<sub>2</sub>O do 1000 ml);

Bufor Tris-HCl

BCIP – (0,5 g 5-bromo-4 chloro-3indolyl phosphatase rozpuszczony w 10ml 100% dimetyloformamidu);

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

Marker masowy dla białek, 266612, Thermo Scientific, Litwa

BSV (V frakcja), A4503, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

Bisakryloamid 30%, A3574, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

TEMED, T9281 Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

Tris, T1503, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

BCIP, B6149, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

NBT, N6876, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

Glicyna, G8898, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

SDS, L4390, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

Inhibitory proteaz, P1860, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

EDTA, E4884, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

IgG antykozie znakowane alkaliczną fosfatazą, A4187, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone

IgG antymysie znakowane alkaliczną fosfatazą, sc-2008, Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone

pan 14-3-3 Antibody (K-19)-G, sc-629-G (poliklonalne kozie), Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone

#### **Przeciwciała pierwotne:**

- przeciwciało monoklonalne mysie anty IgG IL1- $\alpha$  (B-7), nr. kat. sc-9983, Santa Cruz Biotechnology, Stany Zjednoczone
- przeciwciało monoklonalne mysie klasy IgG anty RANKL (clone 70525), nr kat. MAB626, R&D Systems, Stany Zjednoczone

- przeciwciało poliklonalne kozie klasy IgG anty OPG, nr kat. MAB626, R&D Systems, Stany Zjednoczone

**Aparatura:**

Homogenizator nożykowy IKA T10 Basic Ultra Turrax, IKA, Niemcy

Wirówka MR 1812, Jouan, Francja

iBlot® Dry Blotting System, Invitrogen, Stany Zjednoczone

Aparat do analizy żeli Gel Doc 2000, Bio-Rad Laboratories, Stany Zjednoczone

Aparat do rozdzielania żeli poliakrylamidowych, Mini-PROTEAN, Bio-Rad Laboratories, Stany Zjednoczone

**Pomiar stężenia białka**

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

**Przygotowanie ekstraktów białkowych**

Wcześniej zamrożone tkanki rozdrobiono 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% glicerol; 10 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mmol/l Pefabloc SC; 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptyny), a następnie inkubowano w lodzie przez 15 minut.

Otrzymany homogenat wirowano przy  $10000\times g$  przez 15 minut w  $4^\circ\text{C}$ . Supernatant jako ekstrakt białkowy zbierano do nowych probówek i przechowywano w  $-20^\circ\text{C}$  do analizy Western Blot.

**Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym**

Wykonano rozdział (80  $\mu\text{g}$ ) badanego lizatu białkowego na 12% żelu poliakrylamidowym z 3% żelem zagęszczającym o grubości 0,75 mm. Badaną próbkę zamieszczono w buforze obciążającym (BOB) przed nałożeniem na żel poddawano 5-minutowej denaturacji w temperaturze  $98^\circ\text{C}$ . Elektroforeza była prowadzona w buforze SDS-PAGE. Po rozdzielaniu 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. Błone przenoszono do świeżego roztworu zawierającego przeciwciała przeciwko białku OPG (R&D System) w rozcieńczeniu 1:500 oraz przeciwko białku RANKL (R&D System) w rozcieńczeniu 1:500 i przeciwko białku IL-1 $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) w rozcieńczeniu 1:300 oraz 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 200 ml 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. Błone przepłukano w 200 ml TBS. W celu przeprowadzenia reakcji fosfatazy alkalicznej z substratem BCIP/NBT, błonę przenoszono do 100 mM buforu Tris-HCl, pH 9,5 zawierającego 5 mM MgCl<sub>2</sub> oraz BCIP/NBT. Reakcję przeprowadzano przez 30 minut w temperaturze pokojowej i po ukazaniu się wyraźnych prążków reakcję zatrzymywano przez dodanie 20 mM 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 $\alpha$  wyrażano jako stosunek intensywności 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 (ryc. 3).

### 3.3. Metoda badań immunohistochemicznych

Dla ujawnienia ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w 82 preparatach tkankowych guzów i torbieli zębopochodnych zastosowano następującą procedurę badań immunohistochemicznych.

Pobrane w czasie operacji fragmenty tkanki utrwalono w zbuforowanej 4% formalinie i po rutynowej procedurze zatapiano w niskotopliwej parafinie. Z bloków parafinowych krojono skrawki grubości 4  $\mu$ m na mikrotomie SM 2000R Leica. Po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym, a reprezentatywny materiał posłużył do badań immunohistochemicznych stosując następującą procedurę. Parafinowe skrawki grubości 4  $\mu$ m nakładano na szkiełka podstawowe i inkubowano je przez 24 godziny w tempe-



raturze 36°C. Następnie preparat poddano deparafinizacji i dehydratacji. Odzyskanie antygenowości, czyli odsłonięcie epitopów wykonano metodą wysokotemperaturowego odsłaniania epitopów – HIER (*heat induced epitope retrieval*) w buforze firmy DAKO EnVision Flex Target Retrieval Solution w rozcieńczeniu 1:50 (pH 6 użytego buforu). Procedurę przeprowadzono w urządzeniu firmy DAKO PTLINK. Następnie preparaty płukano roztworem PBS przez 3 minuty. Dla zablokowania endogennej peroksydazy skrawki inkubowano w 3% roztworze nadtlenu wodoru przez 5 minut, po czym zostały wypłukane w PBS przez 3 minuty. W kolejnym etapie zastosowano inkubację z przeciwciałem pierwotnym RANKL (R&D Systems), OPG (R&D Systems) lub MMP-9 (Novocastra) w rozcieńczeniu 1:50 przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym płukano w roztworze PBS przez 3 minuty. Aby zwiększyć możliwość penetracji przeciwciała wtórnego sprzęgniętego z polimerem zastosowano dla OPG 2,5% surowicę końską (RTU Normal Horse Serum) przez 20 minut. Następnie nałożono przeciwciało wiążące (wtórne) na 30 minut, które zbudowane jest z fragmentu Fab (królicze/mysie przeciwciało monoklonalne klasy IgG dla RANKL i MMP-9, a kozie przeciwciało monoklonalne klasy IgG dla OPG), wiążącego odpowiednią determinantę antygenową przeciwciała pierwotnego, sprzęgniętego za pomocą polimeru posiadającego w swej budowie dwie grupy wiążące, enzymu peroksydazy. Potem dwukrotnie płukano preparaty w roztworze PBS przez 3 minuty. Barwny produkt uzyskano inkubując skrawki z roztworem czterochloru 3,3' dwuaminobenzylidyny (DAB) przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym płukano pod bieżącą wodą. W końcowym etapie wizualizacji tkanki podbarwiono hematoksyliną przez 5 minut, odwadniano w szeregu stężeń etanolu (70%, 80%, 96%, 100%), prześwietlano w ksylenie przez 3 minuty i zamykano preparaty balsamem kanadyjskim pod szkiełkiem nakrywkowym.

W każdym przypadku stosowano kontrole ujemną, przeprowadzając procedurę barwienia bez przeciwciał pierwotnych. Preparaty te były potwierdzone jako niebarwiące się.

Kontrolą dodatnią dla MMP-9 było oskrzele, dla RANKL – wątroba, a dla OPG – wewnętrzna zmiana olbrzymiokomórkowa.

Preparaty były oglądane w mikroskopie świetlnym (Olympus BX 500). Dla każdego skrawka oceniano intensywność oraz proporcje wybarwienia nabłonka i komórek podścieliska (torebki) w całym preparacie pod różnymi powiększeniami. Reakcja wybarwienia była oceniana półilościowo za pomocą metody H-score [3, 10, 153, 185, 190, 203]. Wynik ten uwzględnia zarówno intensywność

jaki i procentowość wybarwionych komórek w każdej z intensywności. Wynik H-score był obliczany w następujący sposób:

$$\text{H-score} = P1 \times 1 + P2 \times 2 + P3 \times 3$$

P0 – % komórek bez wybarwienia

P1 – % komórek wybarwionych z intensywnością 1

P2 – % komórek wybarwionych z intensywnością 2

P3 – % komórek wybarwionych z intensywnością 3

Intensywność wybarwienia:

0 bez wybarwienia

1 słabe wybarwienie

2 umiarkowane wybarwienie

3 silne wybarwienie

W rezultacie otrzymano wynik w zakresie 0 – 300. 300 oznaczało, iż 100% komórek guza było silnie wybarwionych. W przypadkach H-score poniżej 50 preparat uważano jako ujemny.

**Odczynniki:**

Parafina niskotemperaturowa 52-54°C, POCH, Polska

Szkiełka podstawowe SuperFrost® Plus, Mar-four, Polska

Szkiełka nakrywkowe, POCH, Polska

PBS, POCH, Polska

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, POCH, Polska

Etanol 100%, POCH, Polska

Etanol 96%, POCH, Polska

Etanol 80% POCH, Polska

Etanol 70% POCH, Polska

Ksylen, POCH, Polska

Balsam kanadyjski, POCH, Polska

Hematoksylina, POCH, Polska

czterochlorek 3,3'-dwuaminobenzyny (DAB), DAKO, Dania

EnVision Flex Target Retrieval Solution, DAKO, Dania

EnVision Flex HRP, DAKO, Dania

ImmPRESS™ Anti-Goat Ig Reagent (peroxidase) Polymer Detection Kit, Vector Laboratories, Stany Zjednoczone

**Przeciwciała pierwotne:**

przeciwciało monoklonalne mysie klasy IgG anty-RANKL (clone 70525) nr kat. MAB626, R&D Systems, Stany Zjednoczone

przeciwciało poliklonalne kozie klasy IgG anty-OPG nr kat. MAB626, R&D Systems, Stany Zjednoczone

przeciwciało monoklonalne mysie klasy IgG anty-MMP-9 nr kat. NCL-MMP9-439, Novocastra, Niemcy

**Aparatura:**

Mikroskop Olympus BX50, Japonia

Mikrotom SM 2000R Leica, Niemcy

Cieplarka wodno-elektryczna CEE-2a Elkon, Polska

PTLink Pre-Treatment Module for Tissue Specimens DAKO, Dania

System mikroskopii wirtualnej Olympus VS120-S5, Japonia

### 3.4. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc. Tulsa, Stany Zjednoczone), licencji posiadanej przez Gdański Uniwersytet Medyczny, o numerze JGNP2087539327AR-T. Do szczegółowego opisu zmiennych o charakterze ciągłym wyliczono różne miary położenia ich rozkładu, takie jak: średnia arytmetyczna (z uwzględnieniem odchylenia standardowego), mediana, kwartyly i rozstęp. Przed zastosowaniem odpowiednich statystyk zweryfikowano normalność rozkładów różnych zmiennych ciągłych przy użyciu testu Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa.

Właściwe miary położenia zaznaczano **wytłuszczeniem** dla odpowiedniego rozkładu zmiennej: średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym dla rozkładu normalnego, a medianę i kwartyly dla rozkładu innego niż normalny. Dla rozkładów normalnych wykonano dodatkowo test jednorodności wariancji (test Levene'a). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (*analysis of variance*) jako model wnioskowania statystycznego, a następnie do oce-

ny interakcji wewnątrzgrupowych wykorzystano test post-hoc NIR (Najmniejszych Istotnych Różnic – *Least Significant Differences* – LSD). Dla porównania zmiennych ciągłych o rozkładzie innym niż normalny oraz zmiennych o rozkładzie normalnym z niehomogeniczną wariancją użyto test Kruskala-Wallisa (nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji). Dwie zmienne ilościowe porównano stosując test t-Studenta (dla rozkładu normalnego zmiennej) lub jego nieparametryczny odpowiednik test U Manna-Whitneya (dla zmiennej o rozkładzie innym niż normalny).

Ocenę zależności między zmiennymi jakościowymi wykonano z uwzględnieniem wielkości podgrup i liczebności oczekiwanych. W zależności od wyżej wymienionych parametrów stosowano odpowiednio test Chi-kwadrat z lub bez poprawki Yatesa, V-kwadrat lub test Fishera.

Porównano związki między dwiema zmiennymi ciągłymi, obliczono poziom istotności tych związków, zmierzono ich siłę podając współczynnik korelacji liniowej Pearsona ( $r$ ) oraz wykonano test istotności tego współczynnika w oparciu o próbę losową.

Przy weryfikacji wiarygodności wszystkich hipotez przyjęto graniczny poziom istotności (prawdopodobieństwo testowe,  $p$ ) mniejszy niż 0,05.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Wyniki badań molekularnych

#### 4.1.1. Charakterystyka badanej grupy poddanej analizie Western Blot

Analizę wyników badań z zastosowaniem metody Western Blot przeprowadzono na materiale tkankowym uzyskanym od 86 chorych (37 kobiet i 49 mężczyzn, w wieku od 9 do 89 lat) leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w okresie od 2009 do 2013. Oceniono występowanie czynników RANKL, OPG oraz IL-1 $\alpha$  w tkance guza pochodzącej od 73 chorych z nowotworami i torbielami zębopochodnymi oraz w grupie kontrolnej. Grupę kontrolną dla przeprowadzonych badań stanowiły mieszki zębowe uzyskane od 13 chorych (7 kobiet i 6 mężczyzn, w wieku od 15 do 32 lat) w czasie zabiegu dłutowania całkowicie zatrzymanego dolnego trzeciego trzonowca z przyczyn ortodontycznych. Nie stwierdzono zarówno kieszeni kostnej lub torbieli, a szerokość przestrzeni wokół korony zęba była mniejsza niż 5 mm. Pacjenci z grupy kontrolnej byli ogólnie zdrowi, nie przyjmowali żadnych leków, w tym antybiotyków i leków przeciwzapalnych.

Spośród grupy 73 chorych z nowotworami i torbielami zębopochodnymi 47 (64,38%) zgłosiło się do Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej GUMed z powodu guza torbielowatego szczęki lub żuchwy bez dolegliwości bólowych, który wykryto przypadkowo podczas wykonywania rutynowego zdjęcia rentgenowskiego. Dolegliwości bólowe szczęki lub żuchwy związane ze zmianą zgłaszało 26 (35,62%) chorych. Asymetria twarzy występowała tylko u 12 (16,44%) chorych. W badanej grupie 49 (67,12%) chorych nie przyjmowało żadnych leków na stałe. 24 (32,88%) badanych leczyło się w chwili przyjęcia na przynajmniej jedną przewlekłą chorobę ogólnoustrojową, w tym 3 pacjentów chorowało na cukrzycę typu 2.

Materiał tkankowy uzyskany od chorych w czasie operacji usuwania zmiany z żuchwy lub szczęki został poddany badaniu histopatologicznemu (Katedra i Zakład Patomorfologii GUMed, kierownik prof. dr hab. W. Biernat). Na podstawie badania histopatologicznego rozpoznano: torbiele korzeniowe (RC) u 58 (74,45%), torbiele zawiązkowe (DC) u 9 (12,33%), rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (KCOT) u 4 (5,48%) i szkliwiaki lite (A) u 2 (2,74%) chorych (tab. 1). W żuchwie stwierdzono zmiany u 40 (54,80%) chorych, w szczęce

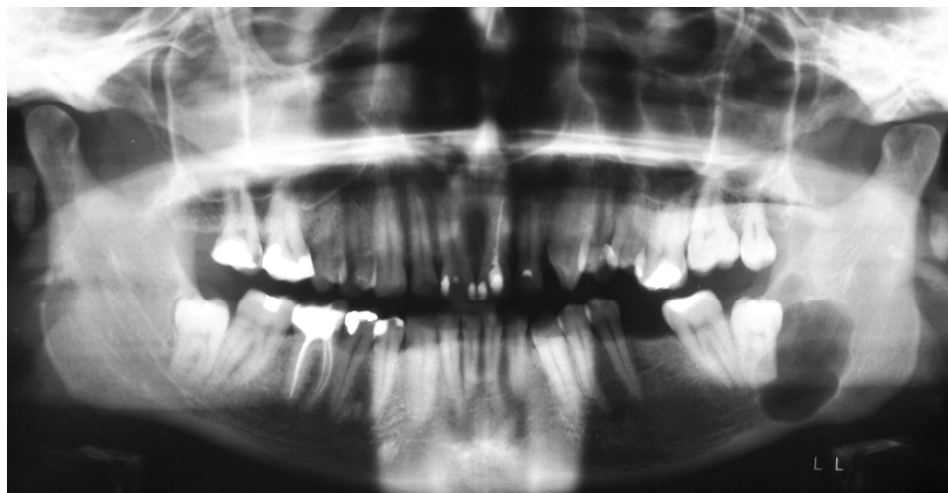
u 33 (45,20%) chorych (tab. 3). Torbiele korzeniowe występowały głównie w grupie mężczyzn w wieku od 30 do 59 roku życia (tab. 1 i 2) (ryc. 2).

Tabela 1. Rodzaj zmian zębopochodnych a płeć chorych; RC – torbiel korzeniowa, DC – torbiel zawiązkowa, KCOT – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, A – szkliwiak; N=73

Table 1. Type of odontogenic lesions and sex of patients; RC – radicular cyst, DC – dentigerous cyst, KCOT – keratocystic odontogenic tumour, A – ameloblastoma; N=73

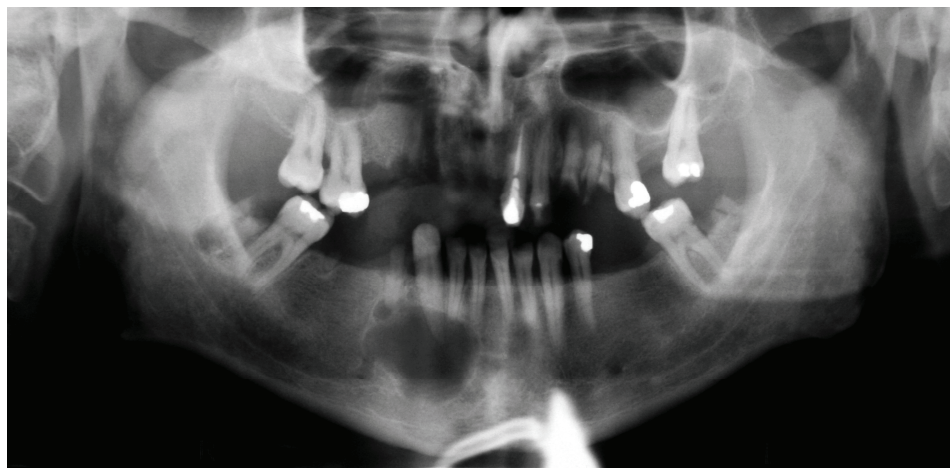
Płeć Sex	RC		DC		KCOT		A		Razem Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Kobiety Women	26	35,62	2	2,74	2	2,74	0	0,00	30	41,10
Mężczyźni Men	32	43,83	7	9,59	2	2,74	2	2,74	43	58,90
Razem Total	58	79,45	9	12,33	4	5,48	2	2,74	73	100,00

Torbiel zawiązkową najczęściej stwierdzano u mężczyzn (w 7 przypadkach z 9) w okolicy dolnych trzecich zębów trzonowych (9,59%) (tab. 1, 2, 3) (ryc. 1).



Rycina 1. Obraz radiologiczny torbieli zawiązkowej żuchwy po stronie lewej

Figure 1. X-ray picture of dentigerous cyst of mandible on the left side



Rycina 2. Obraz radiologiczny torbieli korzeniowej zuchwy po stronie prawej  
 Figure 2. X-ray picture of radicular cyst of mandible on the right side

Tabela 2. Rodzaj zmian zębopochodnych a wiek chorych; N=73  
 Table 2. Type of odontogenic lesion and age of patients; N=73

Wiek (lata) Age (years)	RC		DC		KCOT		A		Razem Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
9 – 29	7	9,59	5	6,85	3	4,11	0	0,00	15	20,55
30 – 59	38	52,05	4	5,48	1	1,37	1	1,37	44	60,27
60 – 89	13	17,81	0	0,00	0	0,00	1	1,37	14	19,18
Razem Total	58	79,45	9	12,33	4	5,48	2	2,74	73	100,00

Rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny głównie występował w zuchwie. Szkliwiak lity umiejscowiony był w trzonie i w kącie zuchwy (tab. 3).

Tabela 3. Rodzaj zmian zębopochodnych a lokalizacja; N=73

Table 3. Type of odontogenic lesion and localization; N=73

Lokalizacja <i>Localization</i>	RC		DC		KCOT		A		Razem <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Szczeka <i>Maxilla</i>	29	39,72	3	4,11	1	1,37	0	0,00	33	45,20
Żuchwa <i>Mandible</i>	29	39,73	6	8,22	3	4,11	2	2,74	40	54,80
Razem <i>Total</i>	58	79,45	9	12,33	4	5,48	2	2,74	73	100,00

Wielkość usuwanych guzów zębopochodnych szczęki i żuchwy wahała się od 0,9 do 6 cm. 57 (78,08%) guzów osiągnęło wymiary od 0,9 do 3 cm, a 21,92% zmian przekroczyło wielkość 3 cm (tab. 4).

Tabela 4. Wielkość zmian zębopochodnych szczęki i żuchwy; N=73

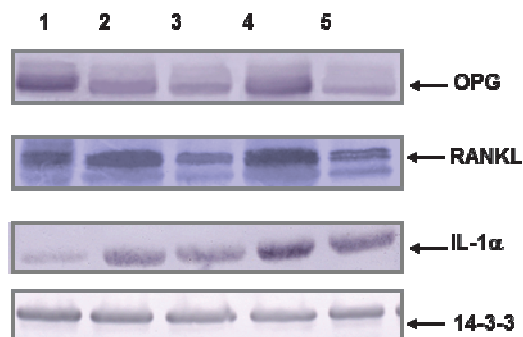
Table 4. Size of odontogenic lesions of jaws; N=73

Wielkość zmiany <i>Size of lesion</i>	RC		DC		KCOT		A		Razem <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0,9 – 3 cm	44	60,27	9	12,33	4	5,48	0	0,00	57	78,08
> 3 cm	14	19,18	0	0,00	0	0,00	2	2,74	16	21,92
Razem <i>Total</i>	58	79,45	9	12,33	4	5,48	2	2,74	73	100,00

#### 4.1.2. Ekspresja RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ na poziomie białka

Poziom białka RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  w guzach zębopochodnych i w grupie kontrolnej (mieszkach zębowych) oceniono na podstawie analizy Western Blot przeprowadzonej na lizatach białkowych uzyskanych z badanych tkanek (ryc. 3).





Rycina 3. Poziom białka OPG, RANKL i IL-1 $\alpha$  w guzach zębopochodnych szczęki i żuchwy. Przykładowy immunoblot lizatów białkowych analizowanych tkanek. Na każdą ścieżkę naniesiono 80  $\mu$ g białka. Ścieżki 1–5 odpowiadają następującym ekstraktom tkankowym: 1 – tkanka kontrolna (mieszek zębowy), 2 – szkliwiak, 3 – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, 4 – torbiel korzeniowa, 5 – torbiel zawiązkowa

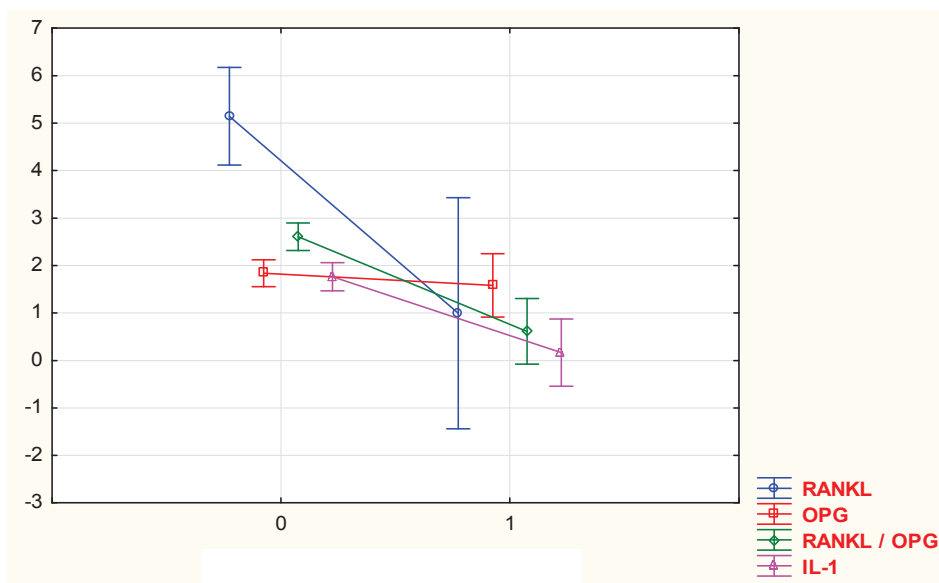
*Figure 3. The OPG, RANKL and IL-1 $\alpha$  protein levels in odontogenic tumours of maxilla and mandible. A typical immunoblotting for protein lysates of the analyzed tissues. The equivalent of 80  $\mu$ g protein was loaded on each lane. Lanes 1 to 5 refer to the respective tissue extracts: 1 – control tissue (dental follicle), 2 – ameloblastoma, 3 – keratocystic odontogenic tumour, 4 – radicular cyst, 5 – dentigerous cyst*

#### **4.1.3. Analiza czynnikowa chorych poddanych badaniu molekularnemu**

Analiza czynnikowa wykazała, że ekspresja RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  nie różni się u chorych w zależności od płci, wieku, ani od obecności chorób towarzyszących w całej badanej grupie (N=89),  $p>0,05$ . Stosunek RANKL/OPG nie różni się u chorych w zależności od płci, wieku, ani od obecności chorób towarzyszących w całej badanej grupie (N=89),  $p>0,05$ .

**4.1.4. Analiza ekspresji RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  oraz stosunku RANKL/OPG w szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych oraz w torbielach korzeniowych i zawiązkowych w porównaniu do grupy kontrolnej**

Analiza Western Blot wykazała statystycznie znamiennej wzrost poziomu białek RANKL i IL-1 $\alpha$  w guzach zębopochodnych kości szczęki i żuchwy (szkliwiakach, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych, torbielach korzeniowych i zawiązkowych) w porównaniu z grupą kontrolną (mieszki zębowe) (ryc. 4).



Rycina 4. Ekspresja RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  oraz stosunek RANKL/OPG w grupie nowotworów i torbieli zębopochodnych (0) w stosunku do grupy kontrolnej (1). Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białko referencyjne)  $p < 0,002$

Figure 4. Expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and RANKL/OPG ratio in odontogenic neoplasms and cysts (0) in relation to the control (1). Protein level was normalized to p 14-3-3 (reference protein)  $p < 0.002$

Poziom białka RANKL (średnia 5,15; SD=4,77) w nowotworach i torbielach zębopochodnych istotnie przewyższał poziom tego białka niż w grupie kontrolnej: RANKL (średnia 0,99; SD=0,43) ( $p<0,002$ ) (tab. 5).

Tabela 5. Porównanie ekspresji RANKL pomiędzy grupą badaną (nowotwory i torbiele zębopochodne) a grupą kontrolną (mieszki zębowe); RC – torbiel korzeniowa, DC – torbiel zawiązkowa, KCOT – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, A – szkliwiak; N=86

Table 5. Comparison of expression of RANKL between the analysed group (odontogenic neoplasms and cysts) and the control group (dental follicles); RC – radicular cyst, DC – dentigerous cyst, KCOT – keratocystic odontogenic tumour, A – ameloblastoma; N=86

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
Mieszki zębowe Dental follicles	13	0,99	0,43	<b>0,48</b>	<b>2,14</b>	<b>0,76</b>	<b>0,85</b>	<b>1,16</b>
RC+DC+KCOT +A	73	5,15	4,77	<b>0,57</b>	<b>25,22</b>	<b>2,32</b>	<b>3,73</b>	<b>6,42</b>
Razem Total	86	4,52	4,64	<b>0,48</b>	<b>25,22</b>	<b>1,33</b>	<b>3,38</b>	<b>5,86</b>

Zaobserwowano niewielki wzrost ekspresji OPG (średnia 1,84; SD=1,27) w zmianach chorobowych w porównaniu do grupy kontrolnej (średnia 1,58; SD=0,74) i nie był on znamieny statystycznie (tab. 6). Tylko w przypadku rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego ekspresja OPG (średnia 0,50; SD=0,29) była istotnie niższa niż w grupie mieszków zębowych ( $p<0,012$ ).

Tabela 6. Porównanie ekspresji OPG pomiędzy grupą badaną (nowotwory i torbiele zębopochodne) a grupą kontrolną (mieszki zębowe); RC – torbiel korzeniowa, DC – torbiel zawiązkowa, KCOT – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, A – szkliwiak; N=86

Table 6. Comparison of expression of OPG between the analysed group (odontogenic neoplasms and cysts) and the control group (dental follicles); RC – radicular cyst, DC – dentigerous cyst, KCOT – keratocystic odontogenic tumour, A – ameloblastoma; N=86

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
Mieszki zębowe Dental follicles	13	1,58	0,74	<b>0,02</b>	<b>2,50</b>	<b>1,24</b>	<b>1,81</b>	<b>2,18</b>
RC+DC+KCOT +A	73	1,84	1,27	<b>0,29</b>	<b>7,04</b>	<b>0,98</b>	<b>1,04</b>	<b>2,49</b>
Razem Total	86	1,80	1,21	<b>0,02</b>	<b>7,04</b>	<b>0,98</b>	<b>1,55</b>	<b>2,36</b>

Stwierdzono, że stosunek RANKL/OPG w zmianach chorobowych (średnia 2,61; SD=1,35) był znacząco wyższy w stosunku do grupy kontrolnej (średnia 0,61; SD=0,29) ( $p < 0,001$ ) (tab. 7).

Tabela 7. Porównanie stosunku RANKL/OPG pomiędzy grupą badaną (nowotwory i torbiele zębopochodne) a grupą kontrolną (mieszki zębowe); RC – torbiel korzeniowa, DC – torbiel zawiązkowa, KCOT – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, A – szkliwiak; N=86  
*Table 7. Comparison of RANKL/OPG ratio between the analysed group (odontogenic neoplasms and cysts) and the control group (dental follicles); RC – radicular cyst, DC – dentigerous cyst, KCOT – keratocystic odontogenic tumour, A – ameloblastoma; N=86*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
Mieszki zębowe <i>Dental follicles</i>	13	0,61	0,29	<b>0,39</b>	<b>1,18</b>	<b>0,42</b>	<b>0,51</b>	<b>0,59</b>
RC+DC+KCOT +A	73	2,61	1,35	<b>0,61</b>	<b>7,51</b>	<b>1,90</b>	<b>2,42</b>	<b>2,84</b>
Razem <i>Total</i>	86	2,30	1,44	<b>0,39</b>	<b>7,51</b>	<b>1,24</b>	<b>2,15</b>	<b>2,78</b>

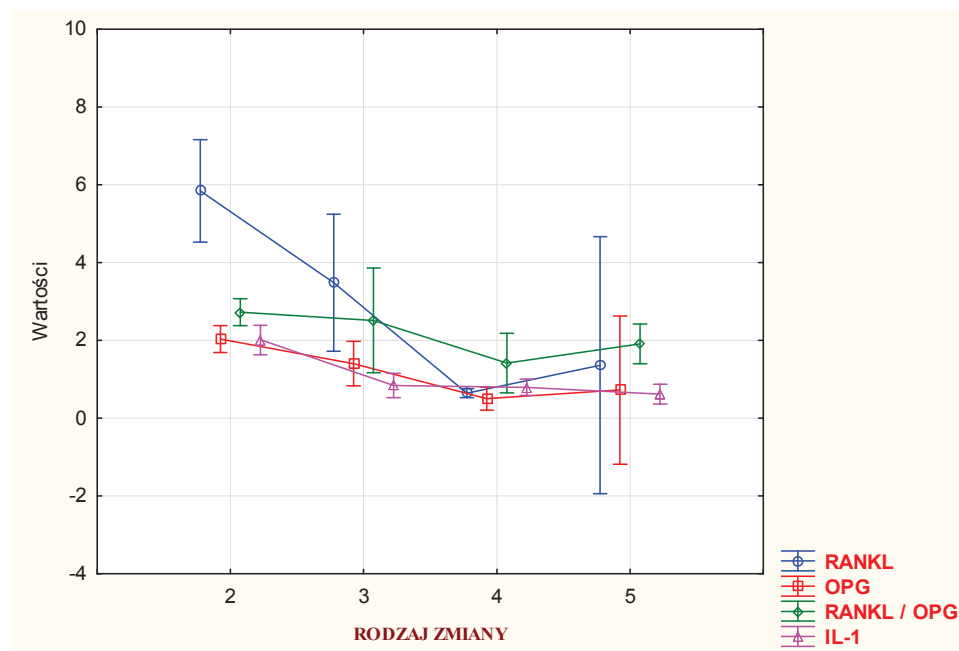
Ponadto analiza Western Blot wykazała istotny wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  w grupie badanej (średnia 1,76; SD=1,38) w porównaniu do grupy kontrolnej (średnia 0,17; SD=0,15) (tab. 8).

Tabela 8. Porównanie ekspresji IL-1 $\alpha$  pomiędzy grupą badaną (nowotwory i torbiele zębopochodne) a grupą kontrolną (mieszki zębowe); RC – torbiel korzeniowa, DC – torbiel zawiązkowa, KCOT – rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny, A – szkliwiak; N=86  
*Table 8. Comparison of expression of IL-1 $\alpha$  between the analysed group (odontogenic neoplasms and cysts) and the control group (dental follicles); RC – radicular cyst, DC – dentigerous cyst, KCOT – keratocystic odontogenic tumour, A – ameloblastoma; N=86*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
Mieszki zębowe <i>Dental follicles</i>	13	0,17	0,15	<b>0,03</b>	<b>0,58</b>	<b>0,10</b>	<b>0,12</b>	<b>0,15</b>
RC+DC+KCOT +A	73	1,76	1,38	<b>0,27</b>	<b>8,52</b>	<b>0,90</b>	<b>1,47</b>	<b>2,02</b>
Razem <i>Total</i>	86	1,52	1,40	<b>0,03</b>	<b>8,52</b>	<b>0,68</b>	<b>1,22</b>	<b>1,91</b>

**4.1.5. Porównanie ekspresji RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  oraz stosunku RANKL/OPG w nowotworach zębopochodnych (szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych) oraz w torbielach zębopochodnych (korzeniowych i zawiązkowych)**

Porównanie ekspresji RANKL w różnych rodzajach zmian zębopochodnych nie wykazało różnic (ryc. 5).



Rycina 5. Poziom ekspresji RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i stosunek RANKL/OPG w torbieli korzeniowej (2), torbieli zawiązkowej (3), rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym (4) i szkliwiaku (5). Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białko referencyjne)  $p < 0,002$

Figure 5. Expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and RANKL/OPG ratio in radicular cyst (2), dentigerous cyst (3), keratocystic odontogenic tumour (4) and ameloblastoma (5). Protein level was normalized to p 14-3-3 (reference protein)  $p < 0.002$

Średnia wartość poziomu białka RANKL w torbieli korzeniowej wynosiła 5,85 (SD=5,01), w torbieli zawiązkowej 3,48 (SD=2,29), w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym 0,64 (SD=0,07), w szkliwiaku 1,36 (SD=0,37) (tab. 9).

Tabela 9. Porównanie ekspresji RANKL pomiędzy rodzajami zmian: torbielą korzeniową (RC), torbielą zawiązkową (DC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT), szkliwiakiem (A), nowotworami zębopochodnymi (KCOT+A) i torbielami zębopochodnym (RC + DC)  
*Table 9. Comparison of the expression of RANKL in types of lesions: radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A), odontogenic neoplasms (KCOT+A) and odontogenic cysts (RC + DC)*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	58	<b>5,85</b>	<b>5,01</b>	0,97	25,22	2,71	4,72	6,86
DC	9	<b>3,48</b>	<b>2,29</b>	0,63	7,35	2,31	2,99	5,13
KCOT	4	<b>0,64</b>	<b>0,07</b>	0,57	0,72	0,58	0,64	0,70
A	2	<b>1,36</b>	<b>0,37</b>	1,10	1,62	1,10	1,36	1,62
KCOT+A	6	<b>0,88</b>	<b>0,41</b>	0,57	1,62	0,59	0,70	1,10
RC+DC	67	<b>5,53</b>	<b>4,79</b>	0,63	25,22	2,55	4,07	6,59
RC+DC+KCOT +A	73	<b>5,15</b>	<b>4,77</b>	0,57	25,22	2,32	3,73	6,42

Istotnie wyższy wzrost ekspresji OPG wykazano w torbieli korzeniowej (średnia 2,04; SD=1,31) niż w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym (średnia 0,50; SD=0,18) ( $p < 0,050$ ). Średnia wartość poziomu OPG w torbieli zawiązkowej wynosiła 1,40 (SD=0,75), a w szkliwiaku 0,72 (SD=0,21) (tab. 10).

Porównanie stosunku RANKL/OPG w różnych rodzajach zmian zębopochodnych nie wykazało różnic (ryc. 5). Średnia wartość stosunku RANKL/OPG w torbieli korzeniowej wynosiła 2,72 (SD=1,31), w torbieli zawiązkowej 2,51 (SD=1,75), w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym 1,42 (SD=0,48), w szkliwiaku 1,91 (SD=0,06) (tab. 11).

Tabela 10. Porównanie ekspresji OPG pomiędzy rodzajami zmian: torbielą korzeniową (RC), torbielą zawiązkową (DC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT), szkliwiakiem (A), nowotworami zębopochodnymi (KCOT+A) i torbielami zębopochodnym (RC+DC)  
*Table 10. Comparison of the expression of OPG in types of lesions: radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A), odontogenic neoplasms (KCOT+A) and odontogenic cysts (RC+DC)*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	58	<b>2,04</b>	<b>1,31</b>	0,29	7,04	1,05	1,90	2,63
DC	9	<b>1,40</b>	<b>0,75</b>	0,55	2,66	1,12	1,12	1,55
KCOT	4	<b>0,50</b>	<b>0,18</b>	0,30	0,74	0,37	0,49	0,64
A	2	<b>0,72</b>	<b>0,21</b>	0,57	0,87	0,57	0,72	0,87
KCOT+A	6	<b>0,58</b>	<b>0,21</b>	0,30	8,87	0,44	0,55	0,74
RC+DC	67	<b>1,95</b>	<b>1,27</b>	0,27	0,29	1,05	1,79	2,63
RC+DC+KCOT +A	73	<b>1,84</b>	<b>1,27</b>	0,29	7,04	0,98	1,53	2,50

Tabela 11. Porównanie stosunku RANKL/OPG pomiędzy rodzajami zmian: torbielą korzeniową (RC), torbielą zawiązkową (DC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT), szkliwiakiem (A) oraz połączonymi grupami: nowotworami zębopochodnymi (KCOT+A) i torbielami zębopochodnym (RC+DC)  
*Table 11. Comparison of RANKL/OPG ratio in types of lesions: radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A), and in combined groups odontogenic neoplasms (KCOT+A), and odontogenic cysts (RC+DC)*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	58	2,72	1,31	<b>0,93</b>	<b>7,51</b>	<b>2,05</b>	<b>2,50</b>	<b>2,88</b>
DC	9	2,51	1,75	<b>0,61</b>	<b>5,73</b>	<b>1,16</b>	<b>2,07</b>	<b>3,16</b>
KCOT	4	1,42	0,48	<b>0,80</b>	<b>1,91</b>	<b>1,05</b>	<b>1,48</b>	<b>1,78</b>
A	2	1,91	0,06	<b>1,87</b>	<b>1,95</b>	<b>1,87</b>	<b>1,91</b>	<b>1,95</b>
KCOT+A	6	1,58	0,45	<b>0,80</b>	<b>1,95</b>	<b>1,30</b>	<b>1,76</b>	<b>1,91</b>
RC+DC	67	2,70	1,37	<b>0,61</b>	<b>7,51</b>	<b>1,96</b>	<b>2,49</b>	<b>2,88</b>
RC+DC+KCO T+A	73	2,61	1,35	<b>0,61</b>	<b>7,51</b>	<b>1,90</b>	<b>2,42</b>	<b>2,84</b>

Znamienny wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  stwierdzono w torbielach korzeniowych (średnia 2,01; SD=1,45) w stosunku do torbieli zawiązkowych (średnia 0,84; SD=0,41) ( $p<0,050$ ). Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że IL-1 $\alpha$  może być jednym z istotnych czynników w przebiegu reakcji zapalnej. W rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym stwierdzono obecność IL-1 $\alpha$  na średnim poziomie wynoszącym 0,80 (SD=0,13), a w szkliwiaku – 0,62 (SD=0,03) (tab. 12).

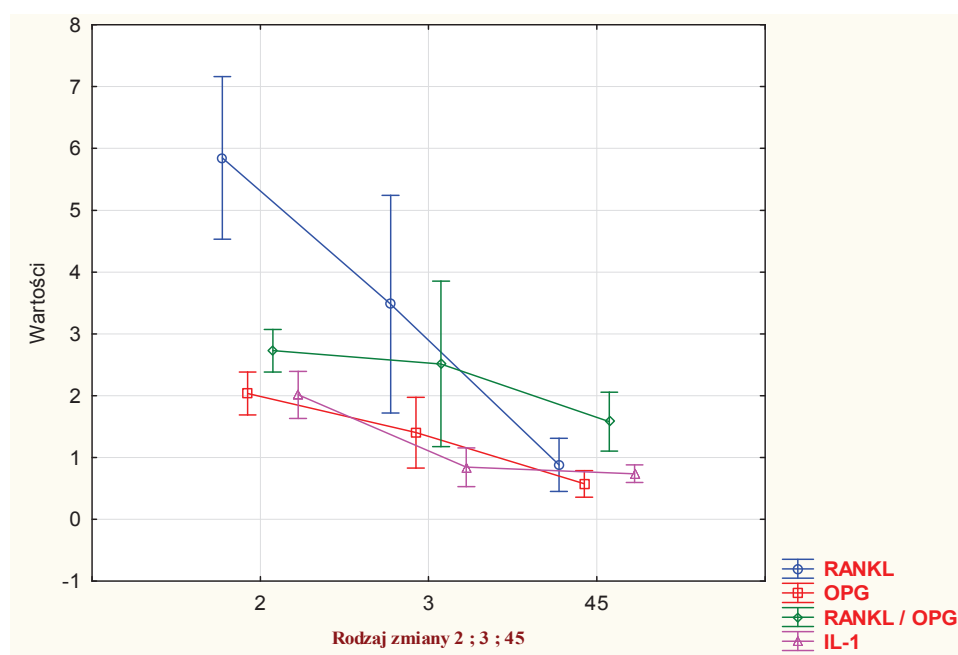
Tabela 12. Porównanie ekspresji IL-1 $\alpha$  pomiędzy rodzajami zmian: torbielą korzeniową (RC), torbielą zawiązkową (DC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT), szkliwiakiem (A), nowotworami zębopochodnymi (KCOT+A) i torbielami zębopochodnym (RC+DC)  
*Table 12. Comparison of expression of IL-1 $\alpha$  in types of lesions: radicular cyst (RC), dentigerous cyst (DC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A), odontogenic neoplasms (KCOT+A), and odontogenic cysts (RC + DC)*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	58	2,01	1,45	<b>0,49</b>	<b>8,52</b>	<b>1,15</b>	<b>1,68</b>	<b>2,22</b>
DC	9	0,84	0,41	<b>0,27</b>	<b>1,54</b>	<b>0,69</b>	<b>0,76</b>	<b>0,90</b>
KCOT	4	0,80	0,13	<b>0,61</b>	<b>0,90</b>	<b>0,71</b>	<b>0,84</b>	<b>0,89</b>
A	2	0,62	0,03	<b>0,60</b>	<b>0,64</b>	<b>0,60</b>	<b>0,62</b>	<b>0,64</b>
KCOT+A	6	0,74	0,14	<b>0,60</b>	<b>0,90</b>	<b>0,61</b>	<b>0,72</b>	<b>0,87</b>
RC + DC	67	1,86	1,41	<b>0,27</b>	<b>8,52</b>	<b>0,96</b>	<b>1,54</b>	<b>2,10</b>
RC+DC+KCOT +A	73	1,76	1,38	<b>0,27</b>	<b>8,52</b>	<b>0,90</b>	<b>1,47</b>	<b>2,02</b>

Wykazano znamienne zależności poziomu badanych białek pomiędzy torbielami korzeniowymi a grupą nowotworów zębopochodnych (KCOT+A). Poziom ekspresji RANKL był w znacznym stopniu wyższy w torbielach korzeniowych (średnia 5,84; SD=5,01) niż w grupie nowotworów zębopochodnych (średnia 0,88; SD=0,41) i był statystycznie różny ( $p<0,025$ ) (ryc. 6). Ponadto stwierdzono istotnie większą ekspresję OPG w torbielach korzeniowych (średnia 2,04; SD=1,31) niż w nowotworach zębopochodnych (średnia 0,58; SD=0,21) ( $p<0,013$ ) (ryc. 6). Wykazano istotny wzrost ekspresji IL1- $\alpha$  w torbielach korzeniowych (średnia 2,01; SD=1,45) w stosunku do grupy nowotworów zębopochodnych (średnia 0,74; SD=0,14) ( $p<0,008$ ) (tab. 12). Wykazano, że nie ma



znamiennej różnicy w stosunku RANKL/OPG pomiędzy torbielami korzeniowymi i zawiązkowymi oraz nowotworami zębopochodnymi (ryc. 6).



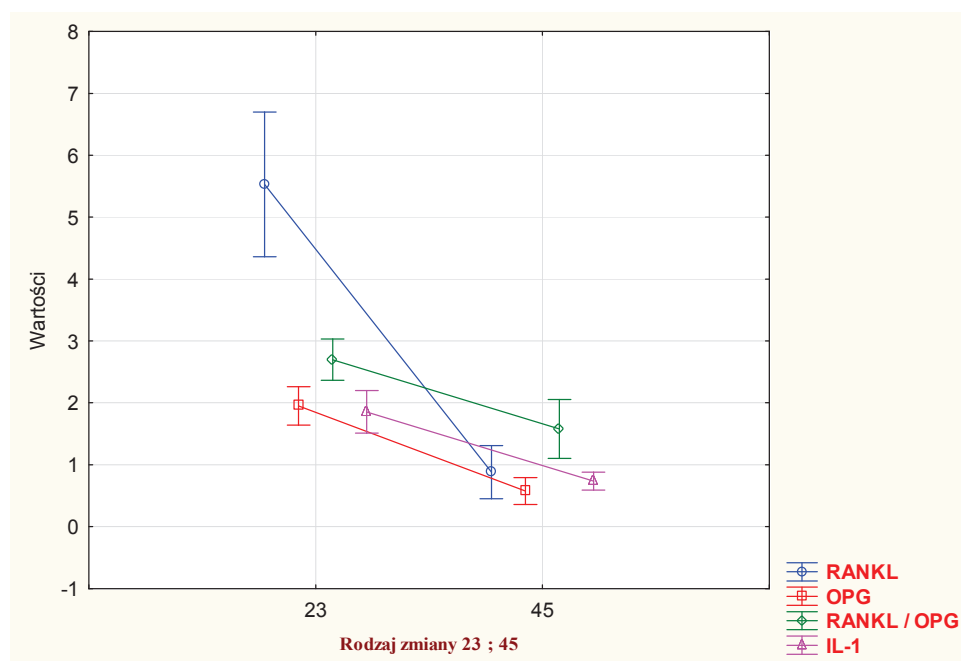
Rycina 6. Ekspresja RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i stosunek RANKL/OPG w torbieli korzeniowej (2), torbieli zawiązkowej (3) oraz w połączonej grupie nowotworów zębopochodnych (rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny i szkliwiak) (4+5). Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białko referencyjne)  $p < 0,002$

Figure 6. Expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and the RANKL/OPG ratio in radicular cyst (2), dentigerous cyst (3) and in combined groups odontogenic neoplasms (keratocystic odontogenic tumour and ameloblastoma) (4+5). Protein level was normalized to p 14-3-3 (reference protein)  $p < 0.002$

Stwierdzono, że ekspresja RANKL i OPG różniła się istotnie pomiędzy grupą torbieli zębopochodnych (RC+DC) a grupą nowotworów zębopochodnych (KCOT + A) (ryc. 7). Poziom ekspresji RANKL w torbielach zębopochodnych (średnia 5,53; SD=4,79) w znacznym stopniu przewyższał poziom ekspresji tych białek w grupie nowotworów zębopochodnych: RANKL (średnia 0,88; SD=0,41) i był znamienne różny ( $p < 0,021$ ). Wykazano istotnie większą ekspre-

sję OPG w torbielach zębopochodnych (średnia 1,95; SD=1,27) niż w nowotworach zębopochodnych (średnia 0,58; SD=0,21) ( $p<0,010$ ).

Stwierdzono, że nie ma znamiennej różnicy w stosunku RANKL/OPG pomiędzy torbielami zębopochodnymi a nowotworami zębopochodnymi (ryc. 7).



Rycina 7. Ekspresja RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i stosunek RANKL/OPG w połączonej grupie torbieli zębopochodnych (torbiel korzeniowa – 2 i torbiel zawiązkowa – 3) oraz w grupie nowotworów zębopochodnych (rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny – 4 i szkliwiak – 5). Poziom białka normalizowano do p 14-3-3 (białko referencyjne);  $p<0,002$

Figure 7. Expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and the RANKL/OPG ratio in combined group odontogenic cysts (radicular cyst – 2, dentigerous cyst – 3) and in group of odontogenic tumours (keratocystic odontogenic tumour – 4 and ameloblastoma – 5). Protein level was normalized to p 14-3-3 (reference protein);  $p<0.002$

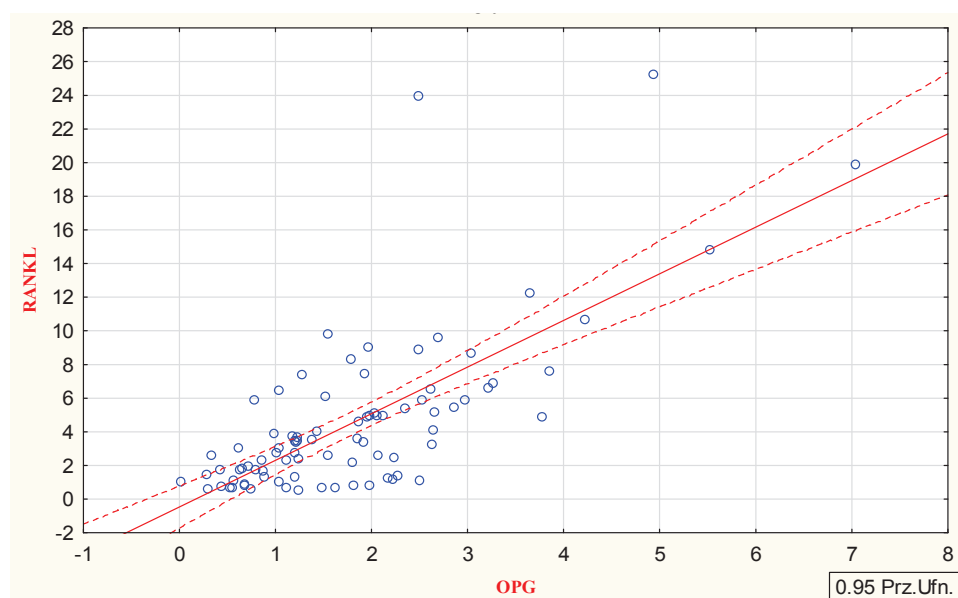
Nie wykazano istotnej różnicy w poziomie IL-1 $\alpha$  pomiędzy torbielami zębopochodnymi a nowotworami zębopochodnym (ryc. 7).

#### **4.1.6. Analiza zależności pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$ a wielkością zmiany**

Analizując wielkość ubytku kostnego w przebiegu zmian zębopochodnych stwierdzono, że w przypadku nowotworów zębopochodnych (przekraczających 3 cm średnicy) obserwowano znamieny wzrost ekspresji RANKL ( $p < 0,012$ ). Zależność ta była istotna tylko dla nowotworów zębopochodnych, natomiast dla torbieli zębopochodnych nie miała związku. Można przypuszczać, że zwiększonej ekspresji RANKL w nowotworach zębopochodnych towarzyszy większa osteoliza kości.

#### **4.1.7. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$**

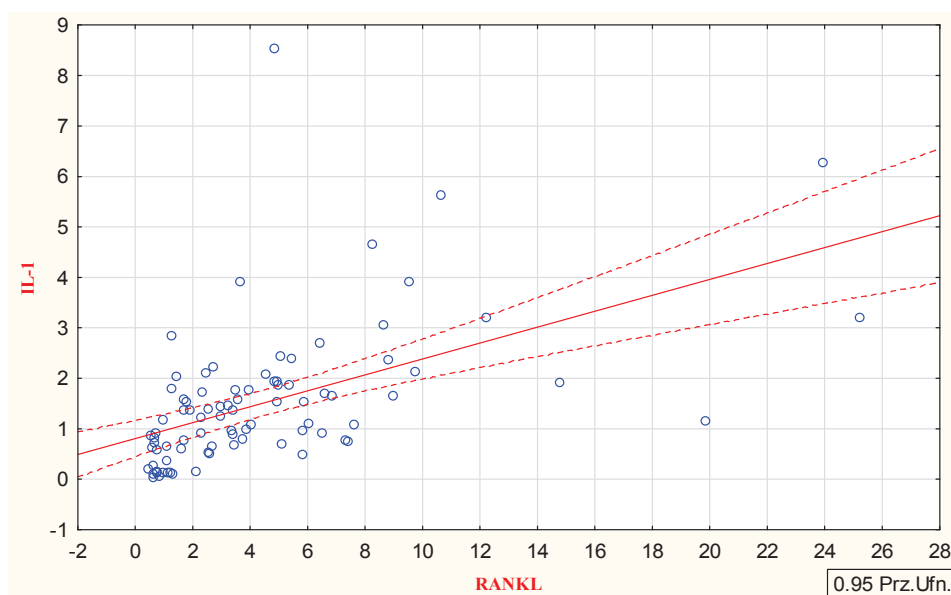
Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała wzajemne korelacje pomiędzy poziomami białek dla RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  w zmianach zębopochodnych. Wykazano silną i istotną korelację pomiędzy ekspresją RANKL i OPG w zmianach chorobowych ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,7$ ) (ryc. 8). Może to sugerować, że poziom RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężony szczególnie w torbielach korzeniowych.



Rycina 8. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL i OPG w zmianach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,7$ )

Figure 8. Positive correlation between expression of RANKL and expression of OPG in odontogenic lesions ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.7$ )

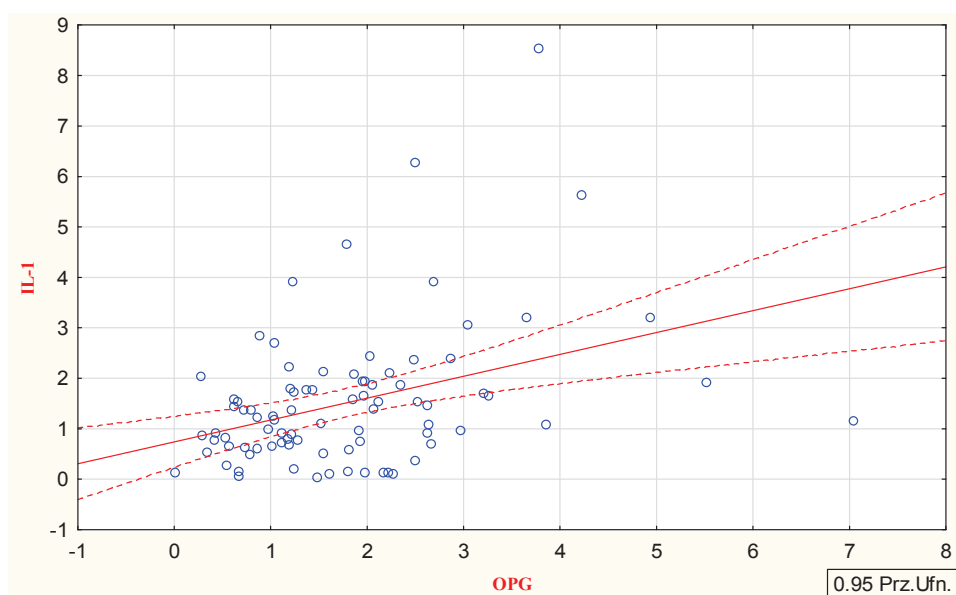
Ekspresja RANKL dodatnio koreluje z ekspresją IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ), a siła związku jest umiarkowana ( $r = 0,5$ ) (ryc. 9).



Rycina 9. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL i IL-1 $\alpha$  w zmianach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,5$ )

*Figure 9. Positive correlation between expression of RANKL and expression of IL-1 $\alpha$  in odontogenic lesions ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.5$ )*

W zmianach zębopochodnych poziom OPG związany jest z poziomem IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,4$ ) (ryc. 10). IL-1 $\alpha$  może być jednym z czynników, który zwiększa poziom zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu reakcji zapalnej.



Rycina 10. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją OPG i IL-1 $\alpha$  w zmianach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,4$ )

Figure 10. Positive correlation between expression of OPG and expression of IL-1 $\alpha$  in odontogenic lesions ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.4$ )

W torbielach korzeniowych wykazano wzajemne i istotne korelacje pomiędzy RANKL i OPG ( $p < 0,016$ ), RANKL i IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,002$ ) oraz OPG i IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,016$ ). Gdy wzrastał poziom RANKL rósł poziom OPG w torbielach korzeniowych, a siła związku była znaczna ( $r = 0,7$ ). Może być to związane z reakcją obronną organizmu na proces lizy kości. Ponadto gdy rósł poziom RANKL wzrastał poziom IL-1 $\alpha$ , a korelacja ta była umiarkowana ( $r = 0,4$ ). Stwierdzono również, że wraz ze wzrostem poziomu IL-1 $\alpha$  nieznacznie rósł poziom OPG ( $r = 0,3$ ).

## 4.2. Wyniki badań immunohistochemicznych ekspresji RANKL, OPG i MMP-9

### 4.2.1. Charakterystyka badanej grupy poddanej analizie immunohistochemicznej

Analizę wyników badań immunohistochemicznych wykonano na materiale tkankowym uzyskanym od 82 chorych z guzami szczęki i żuchwy (39 kobiet i 43 mężczyzn, w wieku od 9 do 89, średnia wieku 49 lat) leczonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej GUMed w latach 2000-2013. Oceniono występowanie czynników RANKL i OPG oraz metaloproteinazy 9 (MMP-9) w tkance guza pochodzącej od chorych z nowotworami i torbielami zębopochodnymi.

W tej grupie chorych 44 (53,66%) zgłosiło się do Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej GUMed z powodu guza torbielowatego szczęki lub żuchwy bez dolegliwości bólowych. Guz u tych chorych wykryto najczęściej przypadkowo podczas wykonywania rutynowego zdjęcia pantomograficznego szczęk. Dolegliwości bólowe związane ze zmianą chorobową zgłaszało 38 (46,34%) pacjentów. Z powodu asymetrii twarzy zgłosiło się 23 (28,05%) chorych (ryc. 11).



Rycina 11. Chora lat 17 – szkliwiak kąta żuchwy po stronie lewej

Figure 11. A 17-year-old female with ameloblastoma of the angle of mandible on the left side

W badanej grupie 69 (84,15%) chorych było ogólnie zdrowych i nie przyjmowało żadnych leków na stałe. 13 (15,85%) badanych leczyło się w chwili przyjęcia na przynajmniej jedną przewlekłą chorobę ogólnoustrojową, w tym 4 pacjentów chorowało na cukrzycę typu 2. Na podstawie badania histopatologicznego ustalono, że u 27 chorych (32,93%) występowała torbiel korzeniowa, u 32 (39,02%) rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny i u 23 (28,05%) szkliwiak (tab. 13) (ryc. 12).



Rycina 12. Chora lat 17 – szkliwiak kąta żuchwy po stronie lewej

*Figure 12. A 17-year-old female with ameloblastoma of the angle of mandible on the left side*

Tabela 13. Rodzaj zmian zębopochodnych a płeć chorych; torbiel korzeniowa (RC), rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (KCOT), szkliwiak (A); N=82

*Table 13. Type of odontogenic lesions and sex of patients; radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A); N=82*

Płeć Sex	RC		KCOT		A		Razem Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Kobiety Women	13	15,85	16	19,51	10	12,20	39	47,56
Mężczyźni Men	14	19,51	16	19,51	13	15,85	43	52,44
Razem Total	27	32,93	32	39,02	23	28,05	82	100,00



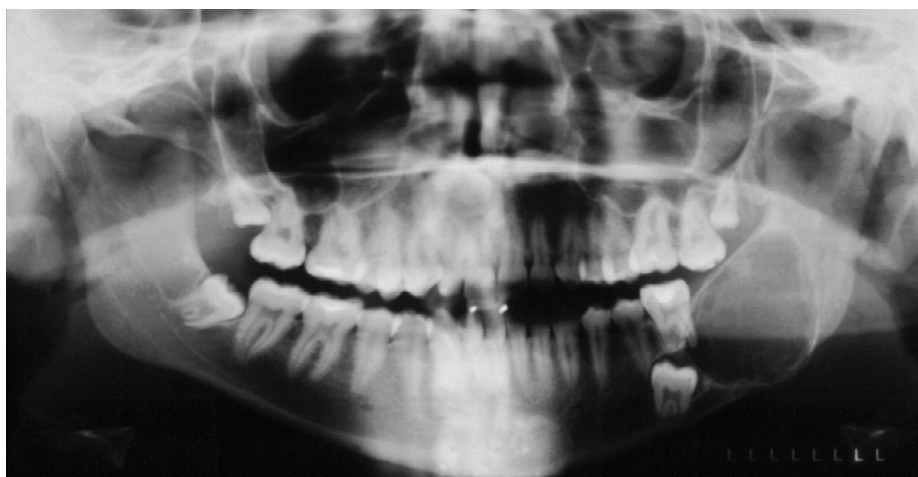
Wiek chorych w tej grupie wahał się od 9 do 89 lat (średnia wieku 49 lat). Zmiany zębopochodne najczęściej występowały w wieku od 30 do 59 roku życia (56,10%), najrzadziej u chorych w wieku od 60 do 89 lat (tab. 14).

Tabela 14. Rodzaj zmian zębopochodnych a wiek chorych; torbiel korzeniowa (RC), rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (KCOT), szkliwiak (A); N=82

Table 14. Type of odontogenic lesions and age of patients; radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A); N=82

Wiek (lata) <i>Age (years)</i>	RC		KCOT		A		Razem <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
9 – 29	5	6,10	16	19,51	6	7,32	27	32,93
30 – 59	19	23,17	16	19,51	11	13,41	46	56,10
60 – 89	3	3,66	0	0	6	7,32	9	10,97
Razem <i>Total</i>	27	32,93	32	39,02	23	28,05	82	100,00

U 46 chorych (56,10%) zmiana osiągnęła wymiar od 0,9 do 3 cm; a u 36 chorych (43,90%) przekroczyła wielkość 3 cm (tab. 15).



Rycina 13. Obraz radiologiczny szkliwiaka kąta żuchwy po stronie lewej

Figure 13. X-ray picture of ameloblastoma of the angle of mandible on the left side

Tabela 15. Wielkość zmian zębopochodnych szczęki i żuchwy; torbiel korzeniowa (RC), rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (KCOT), szkliwiak (A); N=82

Table 15. Size of odontogenic lesions of jaws; radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A); N=82

Średnica zmiany <i>Size of lesion</i>	RC		KCOT		A		Razem <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0,9 – 3 cm	15	18,29	23	28,05	8	9,76	46	56,10
> 3 cm	12	14,64	9	10,97	15	18,29	36	43,90
Razem <i>Total</i>	27	32,93	32	39,02	23	28,05	82	100,00

W badanej grupie chorych torbiel korzeniową w 17 przypadkach z 27 (62,96%) stwierdzono w żuchwie. W żuchwie rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny występował u 26 chorych (83,06%), a w przypadku szkliwiaka u 22 chorych (95,65%) (tab. 16) (ryc. 13).

Tabela 16. Rodzaj zmian zębopochodnych a lokalizacja; torbiel korzeniowa (RC), rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny (KCOT), szkliwiak (A); N=82

Table 16. Type of odontogenic lesions and localization; radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A); N=82

Lokalizacja <i>Localization</i>	RC		KCOT		A		Razem <i>Total</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Szczeka <i>Maxilla</i>	10	37,04	6	16,94	1	4,35	17	20,74
Żuchwa <i>Mandible</i>	17	62,96	26	83,06	22	95,65	65	79,26
Razem <i>Total</i>	27	100,00	32	100,00	23	100,00	82	100,00

#### 4.2.2. Analiza materiału do badania immunohistochemicznego ekspresji RANKL, OPG i MMP-9

Wykonano badania immunohistochemiczne na obecność RANKL, OPG i MMP-9 w tkankach zmian chorobowych usuniętych na drodze operacyjnej.

Poziom białek RANKL, OPG i MMP-9 w badanych preparatach oceniono na podstawie badania immunohistochemicznego.

Materiał tkankowy (N=82) pobrany od pacjentów, który poddano badaniu immunohistochemicznemu stanowiły torbiele korzeniowe (n=27), rogowaciejąco-torbielowate guzy zębopochodne (n=32) i szkliwiaki (n=23). W grupie szkliwiaków rozpoznano: szkliwiaka litego (n=16), szkliwiaka jednokomorowego (n=6) i szkliwiaka obwodowego (n=1). Poziom ekspresji RANKL, OPG oraz MMP-9 oceniano w odniesieniu do ilości immunoreaktywnych komórek w nabłonku oraz podścielisku zmiany chorobowej. RANKL, OPG i MMP-9 stwierdzono przede wszystkim w cytoplazmie komórek nabłonka i podścieliska, niemal we wszystkich subpopulacjach komórek.

Reakcja wybarwienia była oceniana półilościowo za pomocą metody H-score [3, 10, 153, 185, 190, 203]. Wynik ten uwzględnia zarówno intensywność jak i procentowość wybarwionych komórek w każdej z intensywności. Odsetek i intensywność dodatnio wybarwionych komórek guza był oceniany na podstawie oceny całego przekroju guza. Wynik H-score był obliczany w następujący sposób:

$$\text{H-score} = P0 \times 0 + P1 \times 1 + P2 \times 2 + P3 \times 3$$

P0 – % komórek bez wybarwienia

P1 – % komórek wybarwionych z intensywnością 1

P2 – % komórek wybarwionych z intensywnością 2

P3 – % komórek wybarwionych z intensywnością 3

0 bez wybarwienia

1+ słabe wybarwienie

2+ umiarkowane wybarwienie

3+ silne wybarwienie

W rezultacie otrzymano wynik w zakresie 0–300. 300 oznaczało, iż 100% komórek guza było silnie wybarwionych. Ponadto na podstawie wyników H-score, RANKL, OPG, MMP-9 podzielono w poszczególnych zmianach chorobowych na grupy: niskiego RANKL i wysokiego RANKL, niskiego OPG i wysokiego OPG oraz niskiego MMP-9 i wysokiego MMP-9 do dalszej analizy, z punktem odcięcia H-score ustalonym na podstawie median.

Ponadto do określenia stopnia intensywności wybarwienia RANKL, OPG i MMP-9 metodą półilościową (*immunoscore*) zastosowano podział zaproponowany przez Krajewską i wsp. [118]. Każdy przekrój był kwalifikowany pod względem procentowości wybarwienia do następujących kategorii (P): 0 (0–4%), 1 (5–24%), 2 (25–49%), 3 (50–74%) lub 4 (75–100%). Intensywność wybarwienia (I) była oceniana jako 0 (ujemna), 1 (jasno żółta), 2 (żółto-brązowa) lub 3 (ciemno brązowa). Ostatecznie obliczano *immunoscore* w wyniku mnożenia procentu dodatnich komórek (P) przez wynik intensywności wybarwienia (I). *Immunoscore* dla RANKL, OPG i MMP-9 był następnie oceniany i klasyfikowany na cztery grupy:

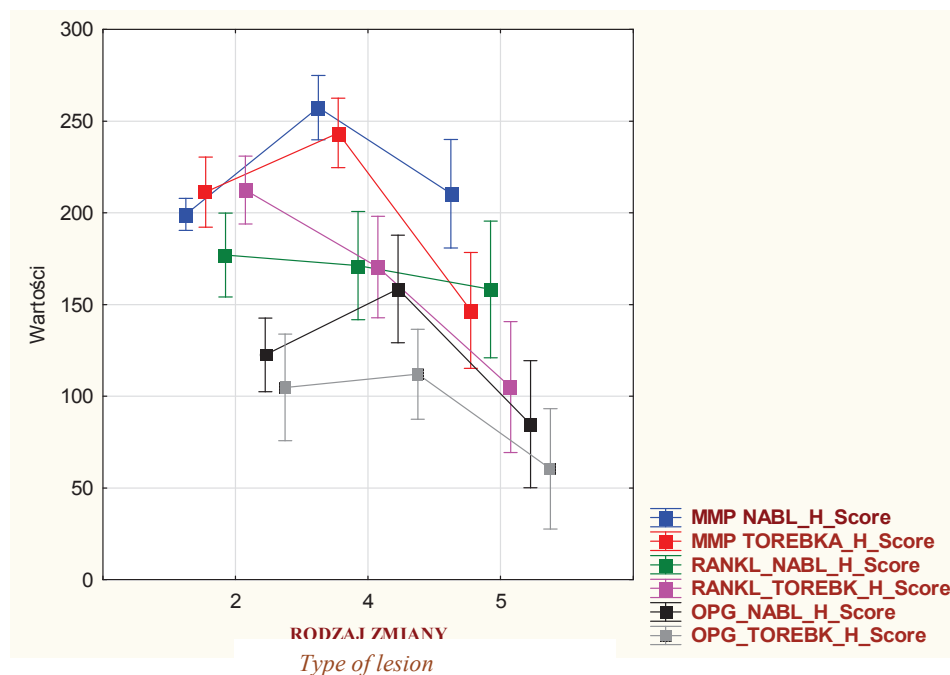
- brak ekspresji (+) wynik 0–2,
- słaba ekspresja (++) wynik 3–5,
- średnia ekspresja (+++) wynik 6–8,
- silna ekspresja (++++) wynik 9–12.

#### **4.2.3. Analiza czynnikowa chorych poddanych badaniu immunohistochemicznemu**

Wykonano analizę czynnikową i stwierdzono, że w badanej grupie chorych płeć, wiek, lokalizacja i choroby towarzyszące nie wpływały istotnie na ekspresję RANKL, OPG oraz MMP-9 ( $p > 0,05$ ).

#### **4.2.4. Analiza metodą półilościową H-score ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i w podścielisku badanych zmian chorobowych**

Badanie immunohistochemiczne (H-score) nie wykazało znamienych różnic w ekspresji RANKL w komórkach nabłonka torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka (tab. 17) (ryc. 14).

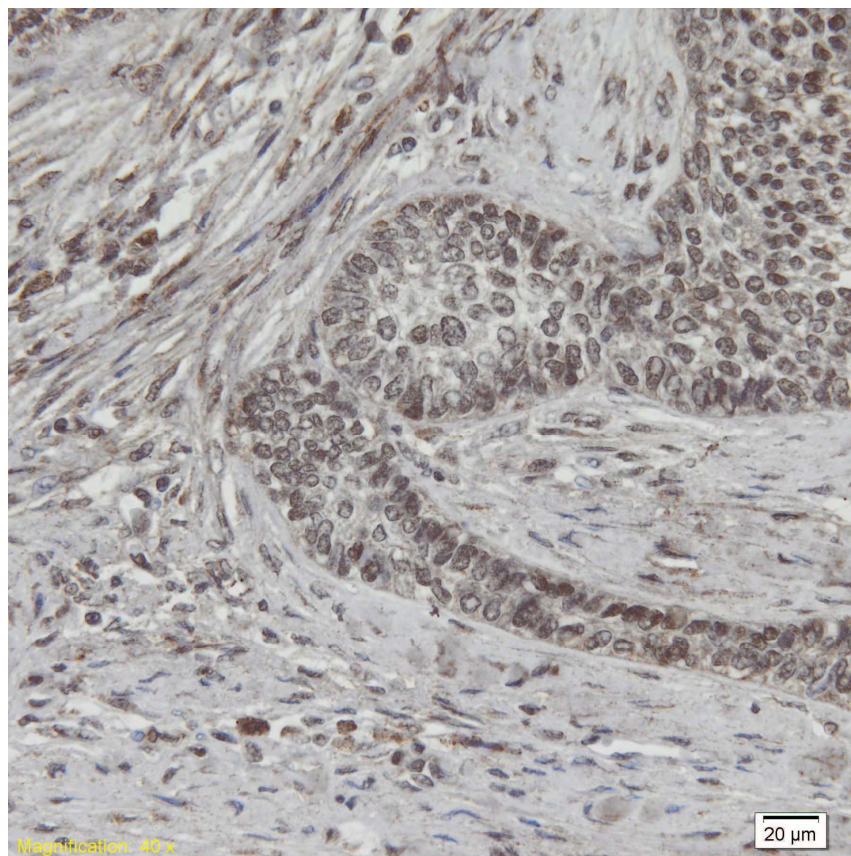


Rycina 14. Ekspresja RANKL, OPG i MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska torbieli korzeniowej (2), rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (4) oraz szkliwiaka (5)  
 Figure 14. Expression of RANKL, OPG, MMP-9 in epithelial and stromal cells of radicular cyst (2), keratocystic odontogenic tumour (4) and ameloblastoma (5)

Tabela 17. Porównanie ekspresji RANKL w komórkach nabłonka pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A); metoda H-score

Table 17. Comparison of expression of RANKL in epithelial cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A); H-score method

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
RC	27	177,04	57,70	100	300	120	200	220
KCOT	32	171,25	81,94	40	300	100	165	235
A	23	158,26	86,11	20	300	100	120	260
Razem Total	82	169,51	75,55	20	300	100	165	230

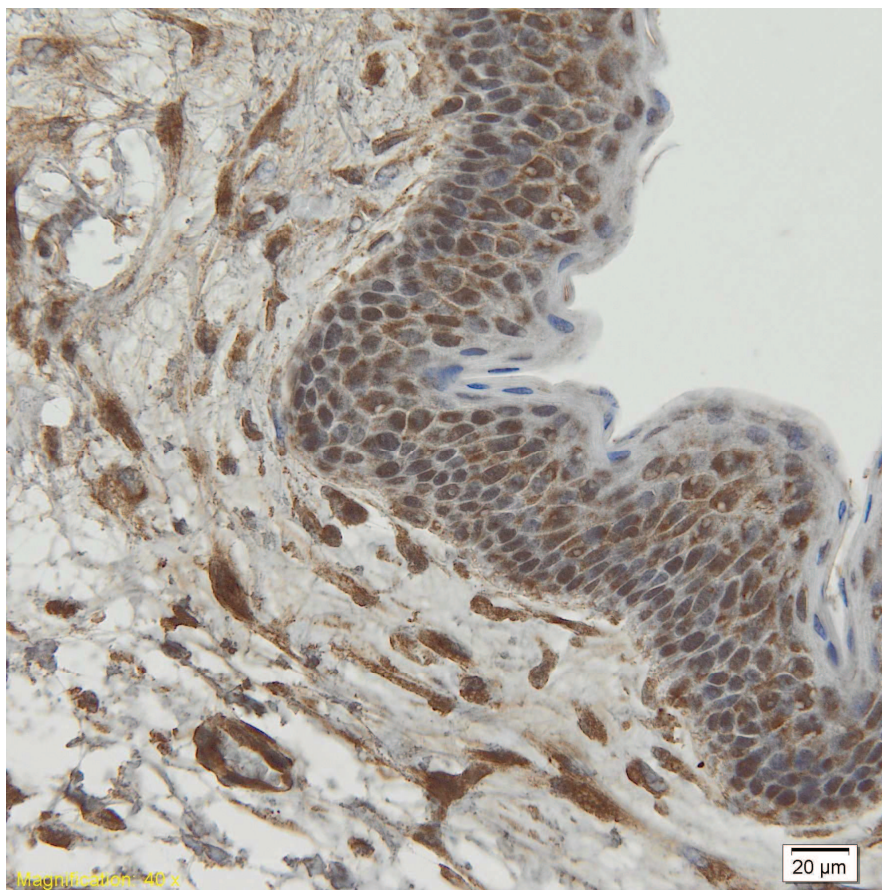


Rycina 15. Ekspresja RANKL w szkliwiaku

*Figure 15. The expression of RANKL in ameloblastoma*

W komórkach podścieliska wykazano znamienne niższy poziom RANKL w szkliwiaku (średnia 105,00; SD=82,56) (ryc. 15) niż w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym (średnia 170,47; SD=76,79) ( $p<0,001$ ) i torbieli korzeniowej (średnia 212,41; SD=46,75) ( $p<0,001$ ). Ponadto stwierdzono istotny wzrost ekspresji RANKL w komórkach podścieliska w torbieli korzeniowej w porównaniu do rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym ( $p<0,024$ ) (tab. 18) (ryc. 16).





Rycina 16. Ekspresja RANKL w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym  
 Figure 16. The expression of RANKL in keratocystic odontogenic tumour

Tabela 18. Porównanie ekspresji RANKL w komórkach podścieliska pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) metoda H-score

Table 18. Comparison of expression of RANKL in stromal cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) H-score method

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
RC	27	212,41	46,75	<b>115</b>	<b>300</b>	<b>190</b>	<b>210,00</b>	<b>240</b>
KCOT	32	170,47	76,79	<b>20</b>	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>200,00</b>	<b>210</b>
A	23	105,00	82,56	<b>0</b>	<b>300</b>	<b>20</b>	<b>100,00</b>	<b>180</b>
Razem Total	82	165,91	81,19	<b>0</b>	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>197,50</b>	<b>210</b>

W przypadku poziomu OPG w komórkach nabłonka stwierdzono, że w znaczącym stopniu przewyższa poziom ekspresji tego białka w komórkach nabłonka rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (średnia 158,44; SD=81,32) niż szkliwiaka (średnia 84,77; SD=78,29 ( $p<0,001$ )) (tab. 19) (ryc. 17).

Tabela 19. Porównanie ekspresji OPG w komórkach nabłonka pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) metoda H-score

*Table 19. Comparison of expression of OPG in epithelial cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) H-score method*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	27	122,59	50,73	<b>0</b>	<b>270</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>120</b>
KCOT	32	158,44	81,32	<b>0</b>	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>215</b>
A	23	84,77	78,29	<b>0</b>	<b>300</b>	<b>20</b>	<b>80</b>	<b>110</b>
Razem <i>Total</i>	82	126,48	76,81	<b>0</b>	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>200</b>

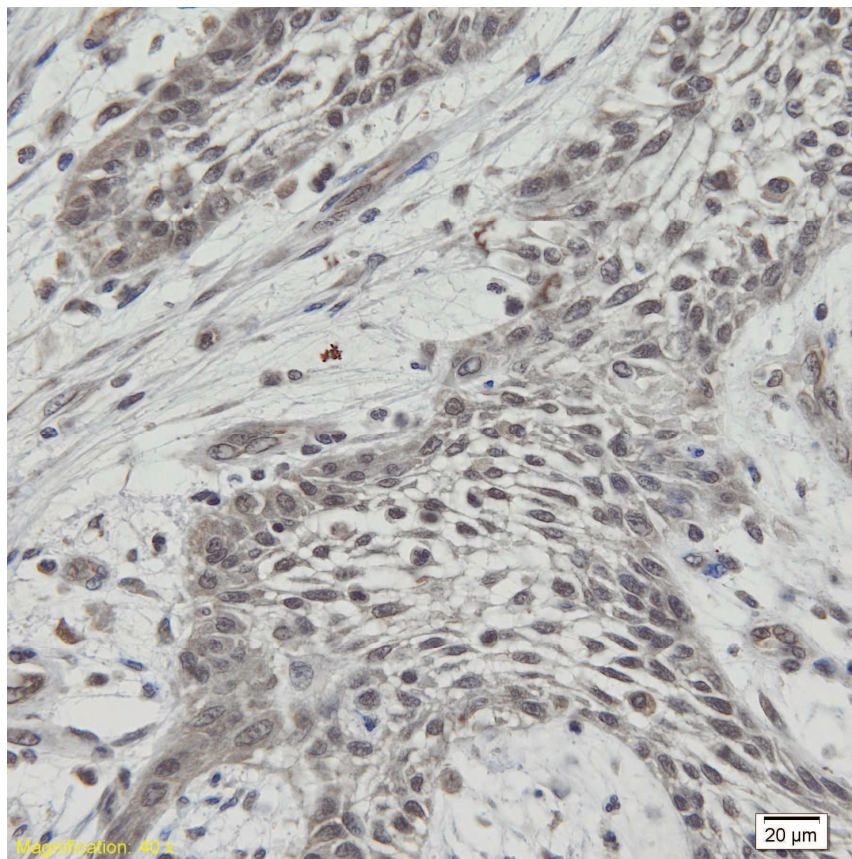
Wykazano istotny wzrost ekspresji OPG w komórkach podścieliska rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (średnia 112,03; SD=67,88) w stosunku do szkliwiaka (średnia 60,46; SD=73,97 ( $p<0,038$ )) (tab. 20).

Tabela 20. Porównanie ekspresji OPG w komórkach podścieliska pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) metoda H-score

*Table 20. Comparison of expression of OPG in stromal cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) H-score method*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	27	104,81	73,35	<b>0</b>	<b>270</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>	<b>160</b>
KCOT	32	112,03	67,88	<b>0</b>	<b>250</b>	<b>70</b>	<b>97,50</b>	<b>165</b>
A	23	60,45	73,97	<b>0</b>	<b>220</b>	<b>0</b>	<b>30,00</b>	<b>90</b>
Razem <i>Total</i>	82	95,61	73,80	<b>0</b>	<b>270</b>	<b>30</b>	<b>90,00</b>	<b>150</b>





Rycina 17. Ekspresja OPG w szkliwiaku  
*Figure 17. The expression of OPG in ameloblastoma*

We wszystkich zmianach zębopochodnych szczęki i żuchwy stwierdzono istotne różnice w zakresie H-score pomiędzy ekspresją MMP-9 w obrębie komórek nabłonka i podścieliska.

Stwierdzono znamienne wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka w rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (średnia 257,42; SD=47,89) w porównaniu do torbieli korzeniowej (średnia 199,20; SD=21,20) ( $p<0,001$ ). Wynik ten sugeruje bardziej agresywny charakter tej zmiany chorobowej. Ponadto wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (średnia 257,42; SD=47,89) był istotnie większy niż w komórkach nabłonka szkliwiaka ( $p<0,001$ ) (tab. 21).

Tabela 21. Porównanie ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) metoda H-score

*Table 21. Comparison of expression of MMP-9 in epithelial cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) H-score method*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	27	199,20	21,20	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>200</b>
KCOT	32	257,41	47,89	<b>140</b>	<b>300</b>	<b>210</b>	<b>270</b>	<b>300</b>
A	23	210,45	66,79	<b>100</b>	<b>300</b>	<b>180</b>	<b>225</b>	<b>270</b>
Razem <i>Total</i>	82	225,51	54,31	<b>100</b>	<b>300</b>	<b>200</b>	<b>210</b>	<b>270</b>

Wykazano znamienne wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach podścieliska rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (średnia 243,55; SD=51,48) w stosunku do ekspresji MMP-9 w komórkach podścieliska torbieli korzeniowej (średnia 211,30; SD=48,37) ( $p<0,033$ ) oraz szkliwiaka (średnia 146,82; SD=71,32) ( $p<0,001$ ). Stwierdzono znamienne wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach podścieliska torbieli korzeniowej w porównaniu do szkliwiaka ( $p<0,001$ ) (tab. 22).

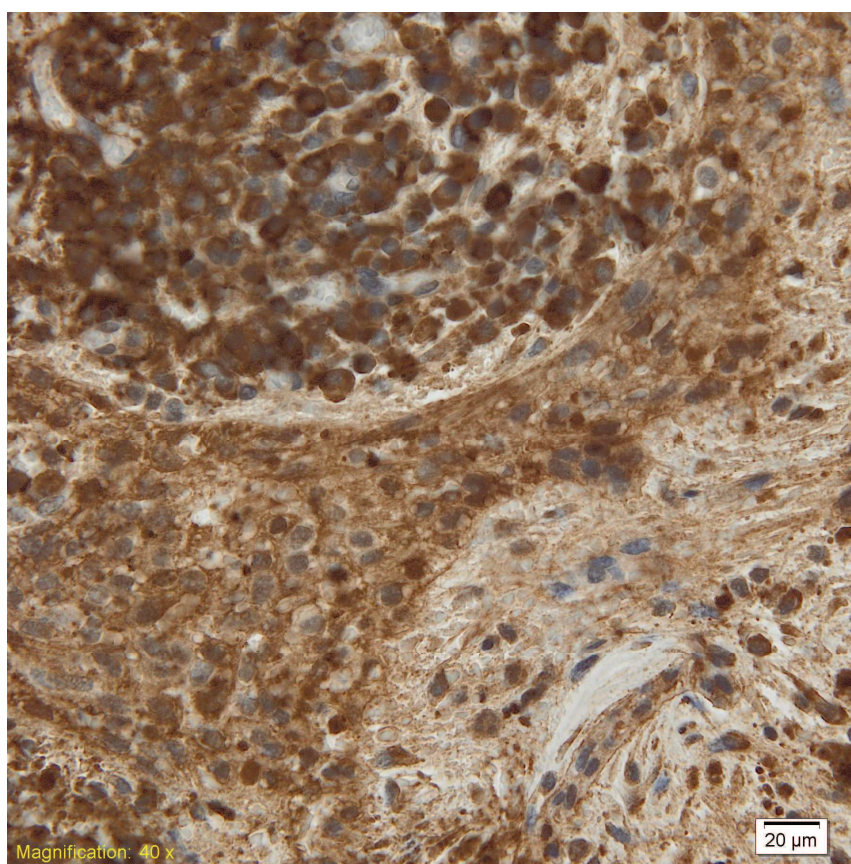
Tabela 22. Porównanie ekspresji MMP-9 w komórkach podścieliska pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT), szkliwiakiem (A) metoda H-score

*Table 22. Comparison of expression of MMP-9 in stromal cells in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT), ameloblastoma (A) H-score method*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	n	Średnia <i>Mean</i>	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana <i>Median</i>	Q75
RC	27	<b>211,30</b>	<b>48,37</b>	140	300	180	200	240,00
KCOT	32	<b>243,55</b>	<b>51,48</b>	150	300	200	240	300,00
A	23	<b>146,82</b>	<b>71,32</b>	20	300	100	140	185,00
Razem <i>Total</i>	82	<b>206,06</b>	<b>68,31</b>	20	300	160	200	257,50

Wyniki H-score RANKL, OPG i MMP-9 podzielono dla poszczególnych zmian chorobowych na: grupy niskiego MMP-9 i wysokiego MMP-9, niskiego RANKL i wysokiego RANKL oraz niskiego OPG i wysokiego OPG z punktem odcięcia H-score ustalonym na podstawie median.

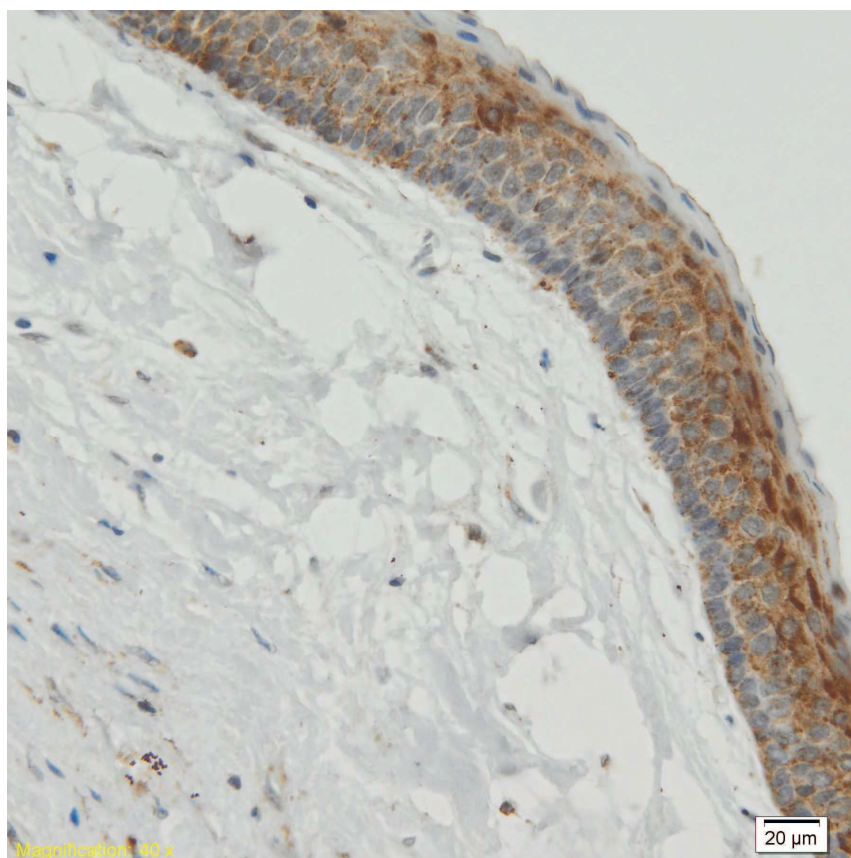
Różnica w ekspresji RANKL w podścielisku, OPG w nabłonku i pościelisku oraz MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy poszczególnymi grupami była znamienna ( $p < 0,001$ ).



Rycina 18. Ekspresja OPG w torbieni korzeniowej  
*Figure 18. The expression of OPG in radicular cyst*



W badanych zmianach zębopochodnych wykazano istotne różnice w ekspresji RANKL zarówno w nabłonku jak i podścielisku pomiędzy zmianami ( $p < 0,001$ ). W torbili korzeniowej istotnie częściej odnotowano w podścielisku ekspresję RANKL o wysokim H-score ( $n=20$ ; 74,07%), w przeciwieństwie do szkliwiaka, gdzie zaobserwowano w 19 przypadkach (82,61%) ekspresję RANKL o niskim poziomie H-score ( $p < 0,001$ ) (tab. 19). W torbielach korzeniowych i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych wykazano istotnie częściej ekspresję OPG o wysokim poziomie H-score w nabłonku  $n=25$  (92,59%) i  $n=29$  (90,63%), w przeciwieństwie do szkliwiaka, gdzie w 54,55% stwierdzano niski H-score ( $p < 0,001$ ) (tab. 23) (ryc. 18, 19).



Rycina 19. Ekspresja OPG w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym  
*Figure 19. The expression of OPG in keratocystic odontogenic tumour*

Tabela 23 Porównanie ekspresji RANKL i OPG w nabłonku (E) i w podścielisku (S) pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) wg podziału na H-score wysoki i niski; N=82 ( $p<0,001$ )

Table 23. Comparison of expressions of RANKL and OPG in epithelium (E) and in stroma (S) between radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) according to the division into low and high H-score; N=82 ( $p<0.001$ )

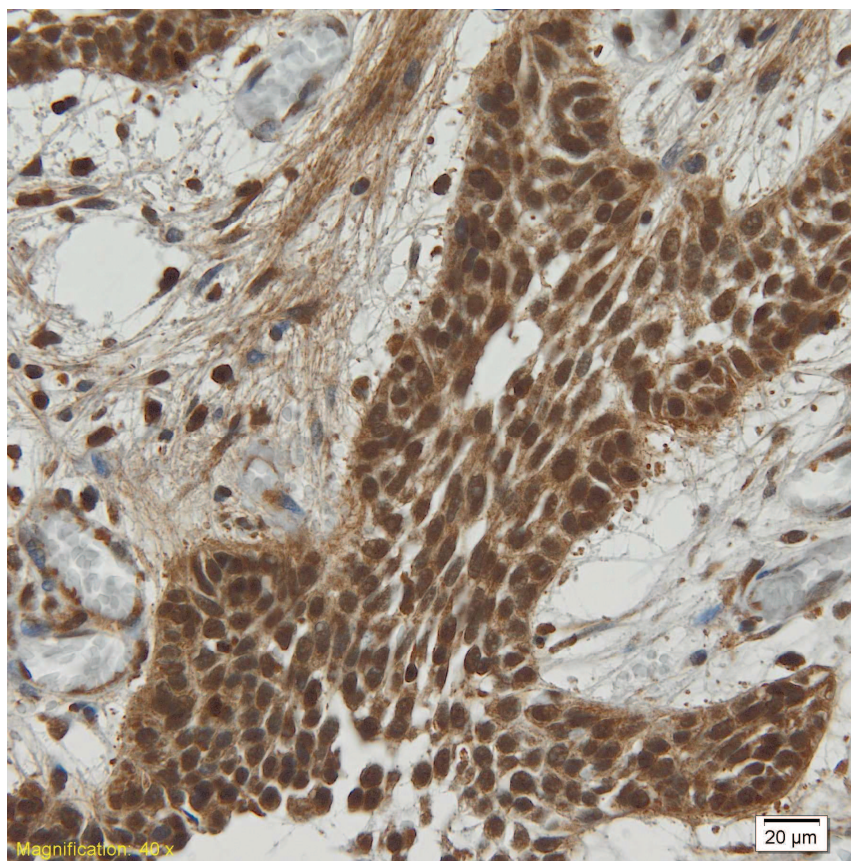
Rodzaj zmiany Type of lesion	Ekspresja OPG Expression of OPG				Ekspresja RANKL Expression of RANKL			
	niski H-score low H-score		wysoki H-score high H-score		niski H-score low H-score		wysoki H-score high H-score	
	n	%	n	%	n	%	n	%
RC (E)	2	7,41	25	92,59	11	40,74	16	59,26
RC (S)	12	44,44	15	55,56	7	25,93	20	74,07
KCOT (E)	3	9,38	29	90,63	16	50,00	16	50,00
KCOT (S)	12	37,50	20	62,50	15	46,88	17	53,13
A (E)	13	56,52	10	43,48	14	60,87	9	39,13
A (S)	17	73,91	6	26,09	19	82,61	4	17,39

Tabela 24. Porównanie ekspresji MMP-9 w nabłonku (E) i w podścielisku (S) pomiędzy torbielą korzeniową (RC), rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym (KCOT) i szkliwiakiem (A) wg. podziału na H-score wysoki i niski; N=82 ( $p<0,001$ )

Table 24. Comparison of expression of MMP-9 in epithelium (E) and in stroma (S) between radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) according to the division into low and high H-score; N=82 ( $p<0.001$ )

Rodzaj zmiany Type of lesion	Ekspresja MMP-9 Expression of MMP-9			
	niski H-score low H-score		wysoki H-score high H-score	
	n	%	n	%
RC (E)	22	81,48	5	18,52
RC (S)	12	44,44	15	55,56
KCOT (E)	6	18,75	26	81,25
KCOT (S)	5	15,62	27	84,38
A (E)	10	43,48	13	56,52
A (S)	18	78,26	5	21,74

W badanych zmianach zębopochodnych ekspresja MMP-9 zarówno w nabłonku jak i podścielisku była wysoka i istotnie różna pomiędzy badanymi zmianami ( $p < 0,001$ ) (ryc. 20, 21, 22). Zmiany o charakterze torbieli korzeniowej istotnie częściej wykazywały w nabłonku niski H-score MMP-9 ( $n=20$ ; 80,00%). W przeciwieństwie do torbieli korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny statystycznie częściej wykazywał ekspresję MMP-9 o wysokim poziomie H-score ( $n=26$ ; 81,25%) (tab. 24).



Rycina 20. Ekspresja MMP-9 w szkliwiaku  
*Figure 20. The expression of MMP-9 in ameloblastoma*

**4.2.5. Analiza metodą półilościową H-score ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków: litym, jednotorbielowatym i obwodowym**

Analiza statystyczna nie wykazała znamiennych różnic w ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków w zakresie H-score. Porównując szkliwiaka litego z jednokomorowym (wyłączając przypadek szkliwiaka obwodowego) nie wykazano istotnych różnic w ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy tymi nowotworami (tab. 25, 26, 27).

Tabela 25. Ekspresja RANKL w nabłonku (E) i podścielisku (S) szkliwiaka litego/wielokomorowego (A-S/M), jednokomorowego (A-U) i obwodowego (A-E/P); N=23

Table 25. Expression of RANKL in epithelium (E) and in stroma (S) in solid/multicystic ameloblastoma (A-S/M), unicystic ameloblastoma (A-U) and extraosseous/peripheral ameloblastoma (A-E/P); N=23

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Ekspresja RANKL Expression of RANKL						Q75
		Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	
A-U (E)	6	200,00	111,71	<b>20,00</b>	<b>280,00</b>	<b>100</b>	<b>260,00</b>	<b>280</b>
A-U (S)	<b>6</b>	<b>143,33</b>	<b>70,90</b>	20,00	200,00	100	170,00	200
A-E/P (E)	1	100,00	0,00	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100</b>	<b>100,00</b>	<b>100</b>
A-E/P (S)	<b>1</b>	<b>20,00</b>	<b>0,00</b>	20,00	20,00	20	20,00	20
A-S/M (E)	16	146,25	75,09	<b>20,00</b>	<b>300,00</b>	<b>100</b>	<b>120,00</b>	<b>205</b>
A-S/M (S)	<b>16</b>	<b>95,94</b>	<b>84,64</b>	0,00	300,00	25	85,00	155

Tabela 26. Ekspresja OPG w nabłonku (E) i podścielisku (S) szkliwiaka litego/wielokomorowego (A-S/M), jednokomorowego (A-U) i obwodowego (A-E/P); N=23

Table 26. Expression of OPG in epithelium (E) and in stroma (S) in solid/multicystic ameloblastoma (A-S/M), unicystic ameloblastoma (A-U) and extraosseous/peripheral ameloblastoma (A-E/P); N=23

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Ekspresja OPG Expression of OPG						
		Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
A-U (E)	6	124,17	121,42	<b>0,00</b>	<b>300,00</b>	<b>5</b>	<b>105,00</b>	<b>230</b>
A-U (S)	6	88,33	94,75	<b>0,00</b>	<b>220,00</b>	<b>0</b>	<b>65,00</b>	<b>180</b>
A-E/P (E)	1	30,00	0,00	<b>30,00</b>	<b>30,00</b>	<b>30</b>	<b>30,00</b>	<b>30</b>
A-E/P (S)	1	0,00	0,00	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>0</b>
A-S/M (E)	16	72,67	53,78	<b>0,00</b>	<b>200,00</b>	<b>20</b>	<b>80,00</b>	<b>110</b>
A-S/M (S)	16	53,33	65,98	<b>0,00</b>	<b>220,00</b>	<b>0</b>	<b>30,00</b>	<b>80</b>

Tabela 27. Ekspresja MMP-9 w nabłonku (E) i podścielisku (S) szkliwiaka litego/wielokomorowego (A-S/M), jednokomorowego (A-U) i obwodowego (A-E/P); N=23

Table 27. Expression of MMP-9 in epithelium (E) and in stroma (S) in solid/multicystic ameloblastoma (A-S/M), unicystic ameloblastoma (A-U) and extraosseous/peripheral ameloblastoma (A-E/P); N=23

Rodzaj zmiany Type of lesion	n	Ekspresja MMP-9 Expression of MMP-9						
		Średnia Mean	SD	Min.	Max.	Q25	Mediana Median	Q75
A-U (E)	6	224,00	73,69	<b>110,00</b>	<b>300,00</b>	<b>200</b>	<b>240,00</b>	<b>270</b>
A-U (S)	6	<b>183,00</b>	<b>43,24</b>	130,00	250,00	170	180,00	185
A-E/P (E)	1	100,00	0,00	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100</b>	<b>100,00</b>	<b>100</b>
A-E/P (S)	1	<b>20,00</b>	<b>0,00</b>	20,00	20,00	20	20,00	20
A-S/M (E)	16	213,13	62,58	<b>100,00</b>	<b>300,00</b>	<b>180,0</b>	<b>225,00</b>	<b>265</b>
A-S/M (S)	16	<b>143,44</b>	<b>71,43</b>	40,00	300,00	92,50	140,00	190



#### 4.2.6. Analiza ekspresji RANKL i OPG w zależności od liczby RANKL- i OPG-dodatnich komórek w nabłonku i podścielisku zmiany (RANKL<OPG, RANKL=OPG i RANKL>OPG)

Wyniki ekspresji RANKL i OPG podzielono w zależności od liczby RANKL- i OPG-dodatnich komórek w nabłonku i podścielisku zmiany na grupy: RANKL<OPG, RANKL=OPG i RANKL>OPG. Stwierdzono, że najczęściej w nabłonku torbieli korzeniowej, rogowacjąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka ekspresja RANKL była równa ekspresji OPG ( $p<0,001$ ). Ponadto wykazano, że w komórkach podścieliska szkliwiaka ekspresja RANKL była istotnie większa od ekspresji OPG ( $p<0,001$ ) (tab. 28).

Tabela 28. Porównanie ekspresji RANKL i OPG w nabłonku (E) i podścielisku (S) torbieli korzeniowej (RC), rogowacjąco-torbielowatego guza zębopochodnego (KCOT) oraz szkliwiaka (A) w zależności od przynależności do grupy: RANKL<OPG, RANKL=OPG, RANKL>OPG; N=82

Table 28. Comparison of expressions of RANKL and OPG in the epithelium (E) and stroma (S) in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and ameloblastoma (A) according to groups: RANKL<OPG, RANKL=OPG, RANKL>OPG; N=82

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	RANKL<OPG		RANKL=OPG		RANKL>OPG	
	n	%	n	%	n	%
RC (E)	0	0,00	25	92,59	2	7,41
RC (S)	1	3,70	12	44,44	14	51,85
KCOT (E)	2	6,25	28	87,50	2	6,25
KCOT (S)	3	9,38	16	50,00	13	40,46
A (E)	1	4,36	12	52,17	10	43,47
A (S)	4	17,39	3	13,04	16	69,57

#### 4.2.7. Analiza oceny poziomu RANKL, OPG i MMP-9 metodą półilościową według podziału na stopnie ekspresji (brak, słaba, średnia, silna)

Przeanalizowano wyniki ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 torbielach korzeniowych, rogowacjąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach pod względem stopnia intensywności i procentu wybarwienia komórek w danej intensywności według podziału Krajewskiej [118].

Obecność RANKL wykazano we wszystkich badanych zmianach zębopochodnych (torbielach zapalnych, rogowacjąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach), niemal we wszystkich subpopulacjach komórek. Silną

ekspresję białka RANKL nabłonku odnotowano we wszystkich przypadkach torbieli korzeniowej, w 29 (90,63%) rogowacząco-torbielowatego guza zębopochodnego, i 18 (78,26%) szkliwiakach, średnią tylko w 5 przypadkach, w tym w 2 (6,25%) rogowacząco-torbielowatych guzach zębopochodnych i w 3 (13,04%) szkliwiakach. W badanych zmianach zębopochodnych wykazano również wysoką ekspresję RANKL w podścielisku u 63 (76,83%), średnią u 6 (7,32%) i niską u 12 (14,63%). Silną ekspresję RANKL w podścielisku stwierdzono przede wszystkim w torbielach korzeniowych (n=25; 92,59%), średni i niski w komórkach podścieliska szkliwiaka (n=8; 34,78%). 24 (75,00%) zmiany o charakterze rogowacząco-torbielowatego guza zębopochodnego wykazywały ekspresję RANKL na wysokim poziomie (tab. 29).

Tabela 29. Ekspresja RANKL w nabłonku (E) i podścielisku (S) torbieli korzeniowej (RC), rogowacząco-torbielowatego guza zębopochodnego (KCOT) oraz szkliwiaka (A) w zależności od stopnia intensywności wybarwienia i procentu wybarwionych komórek w danej intensywności; N=82

Table 29. Expression of RANKL in epithelium (E) and in stroma (S) in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and in ameloblastoma (A) according to the level of intensity of immunostaining and percentage of immunostained cells in each intensity; N=82

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	Ekspresja RANKL <i>Expression of RANKL</i>							
	brak <i>no expression</i>		słaba <i>low</i>		średnia <i>moderate</i>		silna <i>high</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
RC (E)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	27	100,00
RC (S)	0	0,00	0	0,00	2	7,41	25	92,59
KCOT (E)	0	0,00	1	3,13	2	6,25	29	90,63
KCOT (S)	0	0,00	5	15,63	3	9,38	24	75,00
A (E)	0	0,00	2	8,70	3	13,04	18	78,26
A (S)	1	4,35	7	30,43	1	4,35	14	60,87

W badanych zmianach zębopochodnych ekspresja OPG była istotnie różna pomiędzy badanymi zmianami zarówno w nabłonku ( $p < 0,001$ ) jak i podścielisku ( $p < 0,010$ ). Wszystkie zmiany o charakterze torbieli korzeniowej istotnie częściej wykazywały ekspresję OPG w nabłonku na wysokim (n=25; 92,59%) lub średnim (n=2; 7,41%) poziomie. W rogowacząco-torbielowatym guzie zębopo-

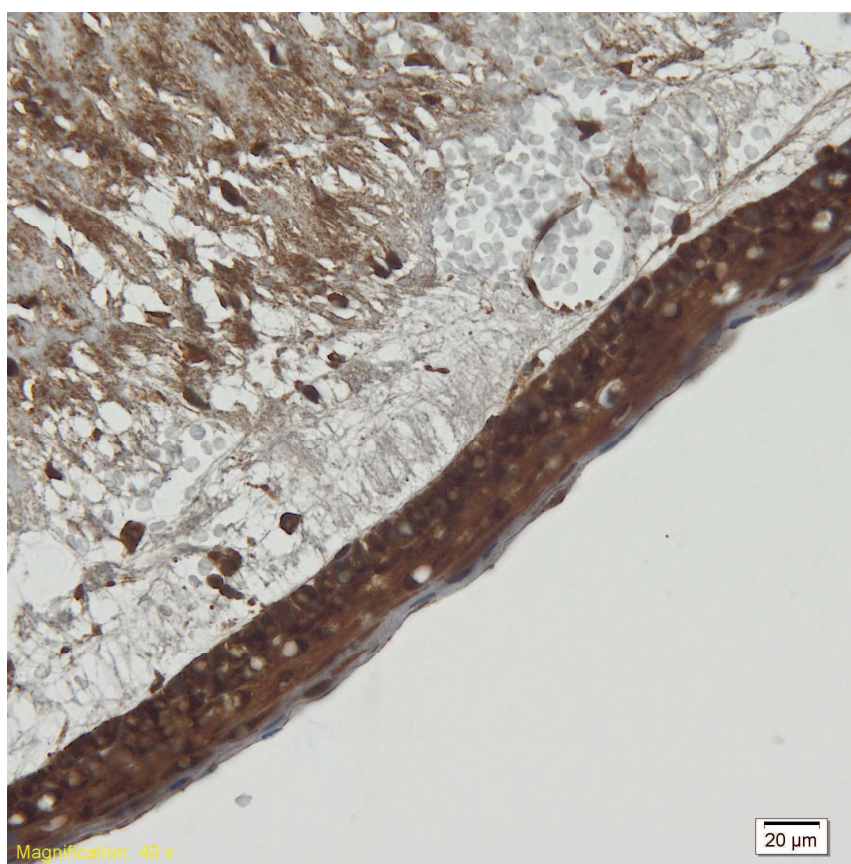
chodnym stwierdzano znamienne częściej silną ekspresję OPG w nabłonku  $n=29$  (90,63%). Niską ekspresję białka OPG wykazano w 6 przypadkach szkliwiaka (27,27%), a w 3 nie stwierdzono ekspresji w nabłonku (tab. 30). Wysoki poziom OPG w podścielisku wykazano głównie w torbielach zapalnych ( $n=13$ ; 48,15%) i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych ( $n=15$ ; 46,88%). W szkliwiaku stwierdzano najczęściej brak ekspresji OPG w podścielisku ( $n=8$ ; 36,36%) lub niski poziom ( $n=6$ ; 27,27%) (tab. 30).

Tabela 30. Ekspresja OPG w nabłonku (E) i podścielisku (S) torbieni korzeniowej (RC), rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (KCOT) oraz szkliwiaka (A) w zależności od stopnia intensywności wybarwienia i procentu wybarwionych komórek w danej intensywności;  $N=82$   
*Table 30. Expression of OPG in epithelium (E) and in stroma (S) in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and in ameloblastoma (A) according to the level of intensity of immunostaining and percentage of immunostained cells in each intensity;  $N=82$*

Rodzaj zmiany Type of lesion	Ekspresja OPG Expression of OPG							
	brak no expression		słaba low		średnia moderate		silna high	
	n	%	n	%	n	%	n	%
RC (E)	0	0,00	0	0,00	2	7,41	25	92,59
RC (S)	1	3,70	7	25,93	6	22,22	13	48,15
KCOT (E)	1	3,13	1	3,13	1	3,13	29	90,63
KCOT (S)	3	9,38	5	15,63	9	28,13	15	46,88
A (E)	3	13,05	6	26,08	1	4,35	13	56,52
A (S)	9	39,13	6	26,08	2	8,71	6	26,08

Obecność MMP-9 stwierdzono we wszystkich badanych zmianach zębopochodnych niemal we wszystkich subpopulacjach komórek zarówno nabłonka jak i podścieliska (tab. 31). Zaobserwowano bardzo wysoką ekspresję MMP-9 w nabłonku badanych zmian w 80 (99,77%) przypadków. Tylko w 1 przypadku (1,23%) odnotowano stopień wybarwienia o intensywności 2 i dotyczył on torbieni korzeniowej. Również wysoki poziom MMP-9 stwierdzono w komórkach podścieliska i wykazano istotne różnice w ekspresji MMP-9 pomiędzy badanymi zmianami chorobowymi ( $p<0,004$ ). Silną ekspresję MMP-9 w komórkach podścieliska wykazano w 60 (75,00%) przypadków, w tym 21 torbielach zapalnych, 28 rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i 11 szkliwiakach.

Średnią ekspresję w komórkach podścieliska MMP-9 zaobserwowano w 15 przypadkach (18,75%), w tym 5 torbielach korzeniowych, 3 rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i w 7 szkliwiakach. Niską ekspresję MMP-9 zauważono tylko w 4 przypadkach (5%). Natomiast tylko w 1 przypadku (torbieni korzeniowej) nie stwierdzono ekspresji MMP-9 w podścielisku (tab. 31).



Rycina 21. Ekspresja MMP-9 w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym  
*Figure 21. The expression of MMP-9 in keratocystic odontogenic tumour*

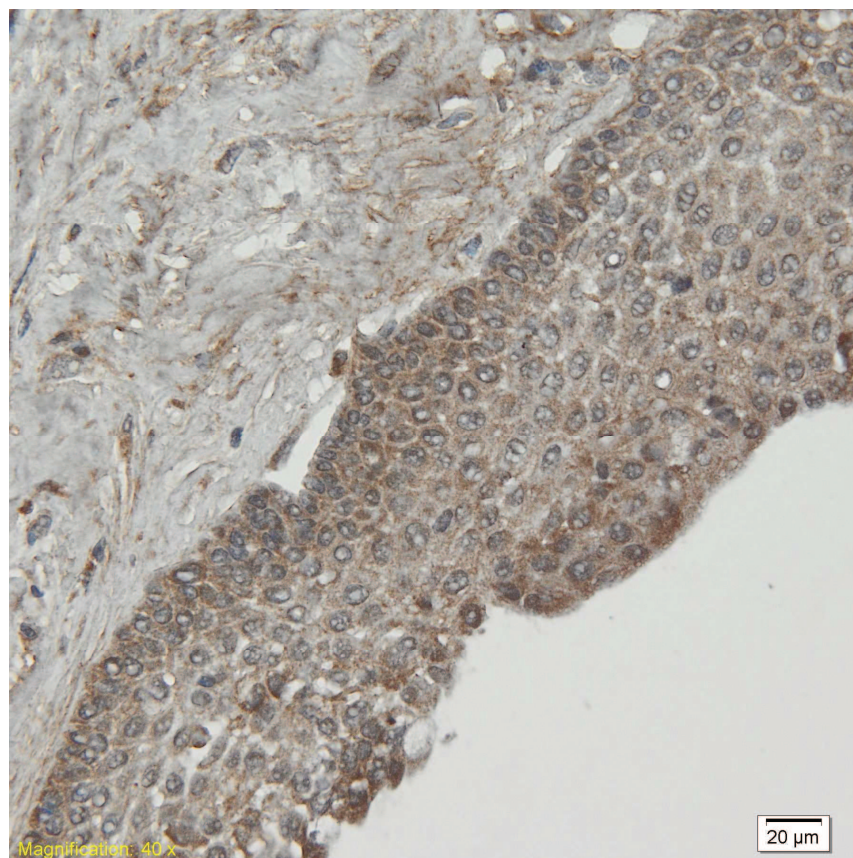
Tabela 31. Ekspresja MMP-9 w nabłonku (E) i podścielisku (S) torbieli korzeniowej (RC), rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego (KCOT) oraz szkliwiaka (A) w zależności od stopnia intensywności wybarwienia i procentu wybarwionych komórek w danej intensywności; N=82

*Table 31. Expression of MMP-9 in epithelium (E) and in stroma (S) in radicular cyst (RC), keratocystic odontogenic tumour (KCOT) and in ameloblastoma (A) according to the level of intensity of immunostaining and percentage of immunostained cells in each intensity; N=82*

Rodzaj zmiany <i>Type of lesion</i>	Ekspresja MMP-9 <i>Expression of MMP-9</i>							
	brak <i>no expression</i>		słaba <i>low</i>		średnia <i>moderate</i>		silna <i>high</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
RC (E)	0	0,00	0	0,00	1	3,70	26	96,30
RC (S)	1	3,70	0	0,00	5	18,52	21	77,78
KCOT (E)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	32	100,00
KCOT (S)	0	0,00	0	0,00	3	9,37	29	90,63
A (E)	0	0,00	0	0,00	0	0,00	23	100,00
A (S)	0	0,00	4	17,40	7	30,43	12	52,17

Porównano stopień wybarwienia nabłonka do podścieliska. W przypadku ekspresji MMP-9 ekspresja w obrębie nabłonka i podścieliska była równie wysoka. W każdym przypadku torbieli korzeniowej i rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego obserwowano, że ekspresja OPG była wyższa w nabłonku niż w torebce. W szkliwiaku zauważono w 2 z 22 przypadków (9,09%) większą ekspresję OPG w podścielisku niż w nabłonku. W każdym przypadku torbieli korzeniowej i szkliwiaka ekspresja RANKL była wyższa w nabłonku niż podścielisku. Tylko w 1 z 32 (3,13%) przypadków rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego zauważono wyższą ekspresję RANKL w torebce niż w nabłonku.





Rycina 22. Ekspresja MMP-9 w torbieni korzeniowej

Figure 22. The expression of RANKL in radicular cyst

#### **4.2.8. Analiza zależności pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i MMP-9 a wielkością zmiany**

Najwięcej komórek z wysokim poziomem ekspresji RANKL w nabłonku odnotowano w zmianach o średnicy 0,9–3 cm (n=41). Najwięcej komórek z wysoką ekspresją RANKL w podścielisku zauważono w zmianach o średnicy 0,9–3 cm (n=35). Porównując poziom ekspresji OPG w nabłonku z wielkością zmiany wykazano, że ekspresja na niskim poziomie była w 28 zmianach zębopochodnych o średnicy 0,9–3 cm. Niską ekspresję stwierdzano głównie w zmianach o średnicy 0,9–3 cm (n=24). Wysoką ekspresję MMP-9 w nabłonku

stwierdzono w 34 zmianach > 3 cm, a wysoką ekspresję MMP-9 w podścielisku wykazano w 38 zmianach > 3 cm. Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności między ekspresją RANKL, OPG ani MMP-9 a wielkością zmiany.

#### 4.2.9. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i MMP-9 w całej badanej grupie

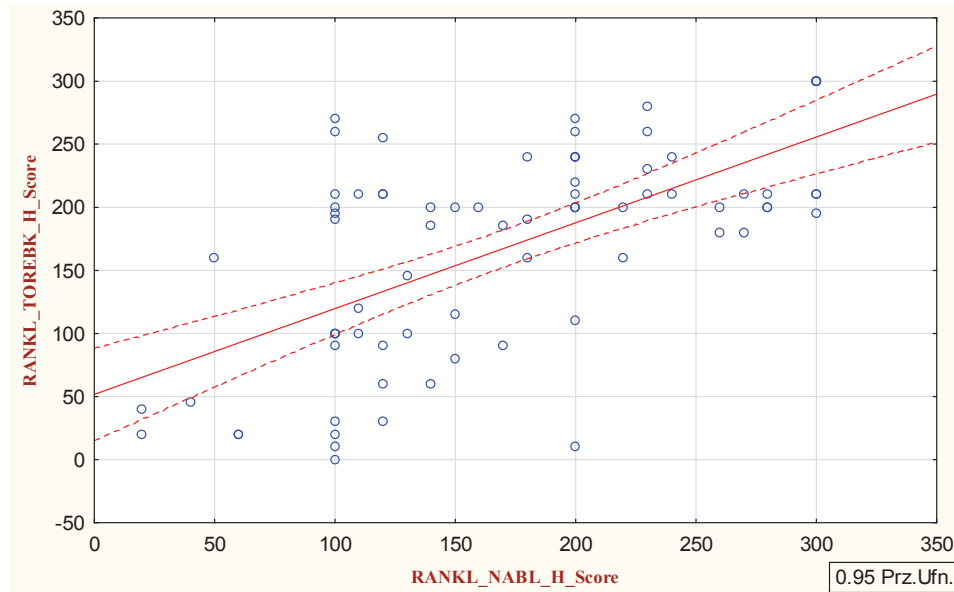
Analiza statystyczna wzajemnych zależności pomiędzy poziomami badanych metodą immunohistochemiczną białek wykazała korelację pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska w całej grupie badanej (tab. 32).

Tabela 32. Współzależności pomiędzy poziomami badanych białek RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku (E) i podścielisku (S) we wszystkich badanych zmianach chorobowych (p – poziom istotności, r – współczynnik korelacji)

Table 32. Correlations between analysed proteins of RANKL, OPG and MMP-9 levels in epithelium (E) and stroma (S) in all analysed lesions (p – value, r – correlation coefficient)

	MMP-9 (E)		MMP-9 (S)		RANKL (E)		RANKL (S)		OPG (E)		OPG (S)	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
MMP-9 (E)			0,5	0,001	0,2	0,127	0,2	0,149	0,2	0,033	0,1	0,409
MMP-9 (S)	0,5	0,001			0,1	0,277	0,4	0,001	0,3	0,004	0,3	0,003
RANKL (E)	0,2	0,127	0,1	0,277			0,6	0,001	0,3	0,031	0,2	0,106
RANKL (S)	0,2	0,149	0,4	0,001	0,6	0,001			0,3	0,01	0,3	0,014
OPG (E)	0,2	0,033	0,3	0,004	0,3	0,031	0,3	0,01			0,6	0,001
OPG (S)	0,1	0,409	0,3	0,003	0,2	0,106	0,3	0,014	0,6	0,001		

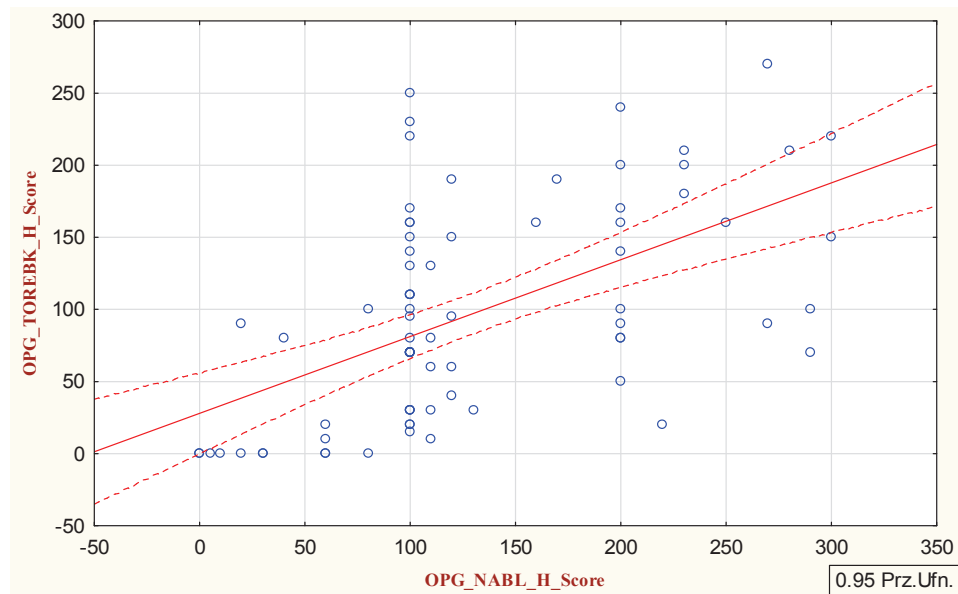
W całej grupie badanej wykazano dodatnie korelacje pomiędzy poziomem RANKL w nabłonku a RANKL w torebce ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,4$ ) (ryc. 23), OPG w nabłonku a OPG w torebce ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,6$ ) (ryc. 24), MMP-9 w nabłonku a MMP-9 w torebce ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,5$ ) (ryc. 25).



Rycina 23. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL w nabłonku i RANKL w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych;  $N=82$ , ( $p<0,001$ ;  $r=0,4$ )

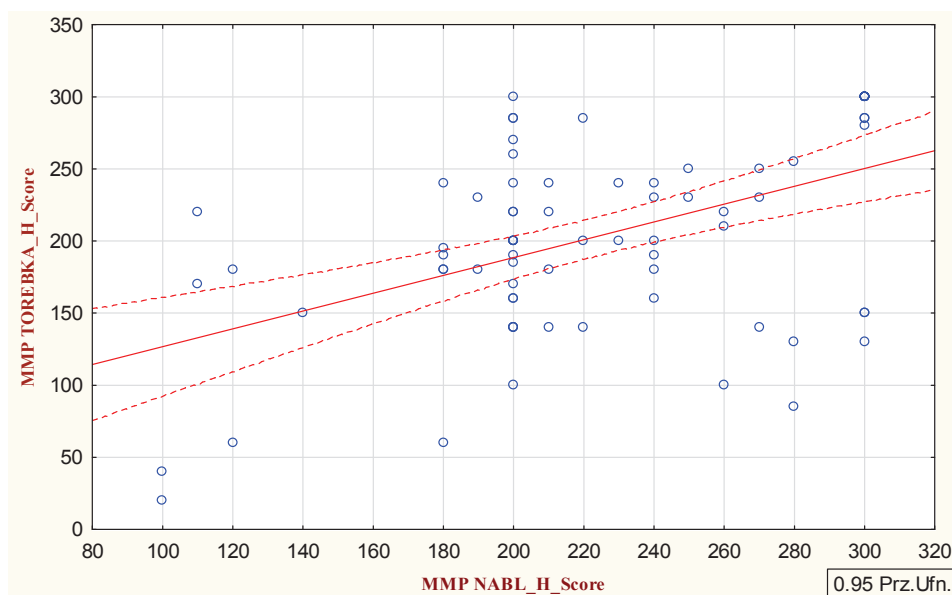
Figure 23. Positive correlation between expression of RANKL in epithelium and expression of RANKL in stroma in all analysed lesions;  $N=82$ , ( $p=0.001$ ;  $r=0.4$ )





Rycina 24. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją OPG w nabłonku i OPG w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82, ( $p<0,001$ ;  $r=0,6$ )

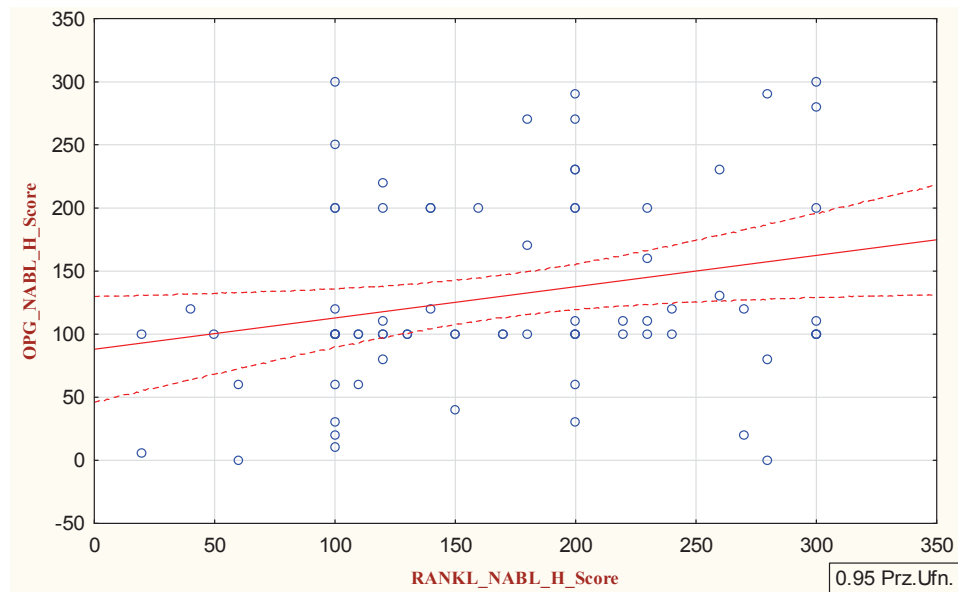
Figure 24. Positive correlation between expression of OPG in epithelium and expression of OPG in stroma in all analysed lesions; N=82, ( $p=0.00$ ;  $r=0.6$ )



Rycina 25. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MMP-9 w nabłonku i MMP-9 w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych;  $N=82$ , ( $p<0,001$ ;  $r=0,5$ )

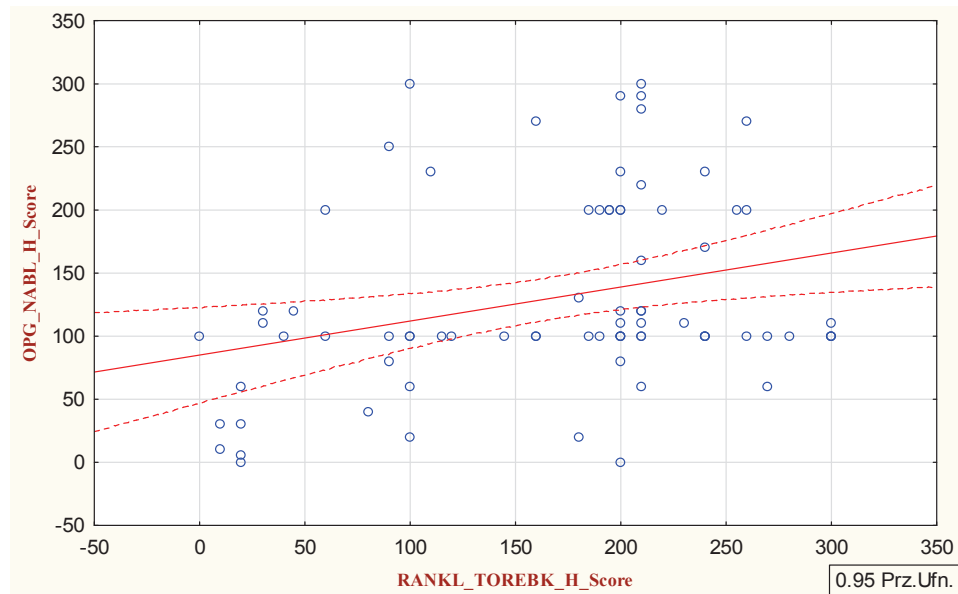
*Figure 25. Positive correlation between expression of MMP-9 in epithelium and expression of MMP-9 in stroma in all analysed lesions;  $N=82$ , ( $p=0.001$ ;  $r=0.5$ )*

W całej badanej grupie stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją RANKL w nabłonku a ekspresją OPG w nabłonku ( $p<0,031$ ;  $r=0,3$ ) (ryc. 26), ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w nabłonku ( $p<0,010$ ;  $r=0,3$ ) (ryc. 27), ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w torebce ( $p<0,014$ ;  $r=0,3$ ) (ryc. 28).



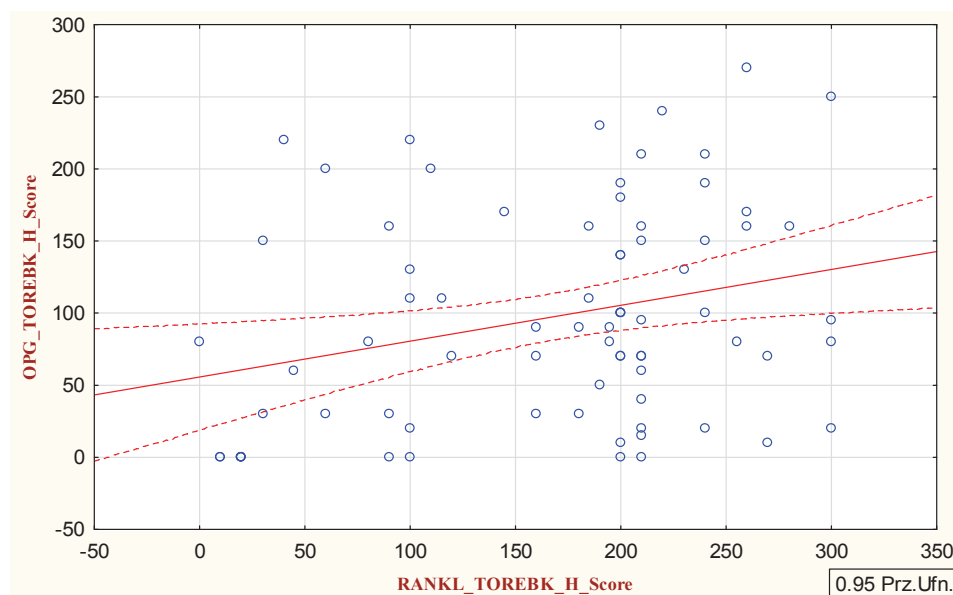
Rycina 26. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL w nabłonku i OPG w nabłonku we wszystkich badanych zmianach chorobowych;  $N=82$ , ( $p=0,031$ ,  $r=0,3$ )

*Figure 26. Positive correlation between expression of RANKL in epithelium and expression of OPG in epithelium in all analysed lesions;  $N=82$ , ( $p=0.031$ ,  $r=0.3$ )*



Rycina 27. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL w podścielisku i OPG w nabłonku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82 ( $p=0,010$ ;  $r=0,3$ )

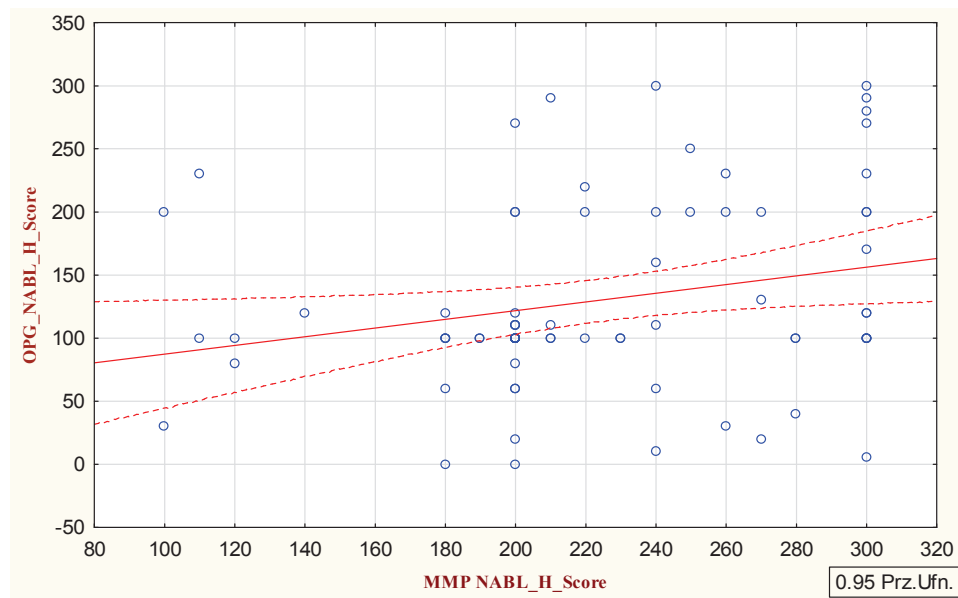
Figure 27. Positive correlation between expression of RANKL in stroma and expression of OPG in epithelium in all analysed lesions; N=82 ( $p=0.010$ ;  $r=0.3$ )



Rycina 28. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją RANKL w podścielisku i OPG w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych;  $N=82$ , ( $p=0,014$ ;  $r=0,3$ )

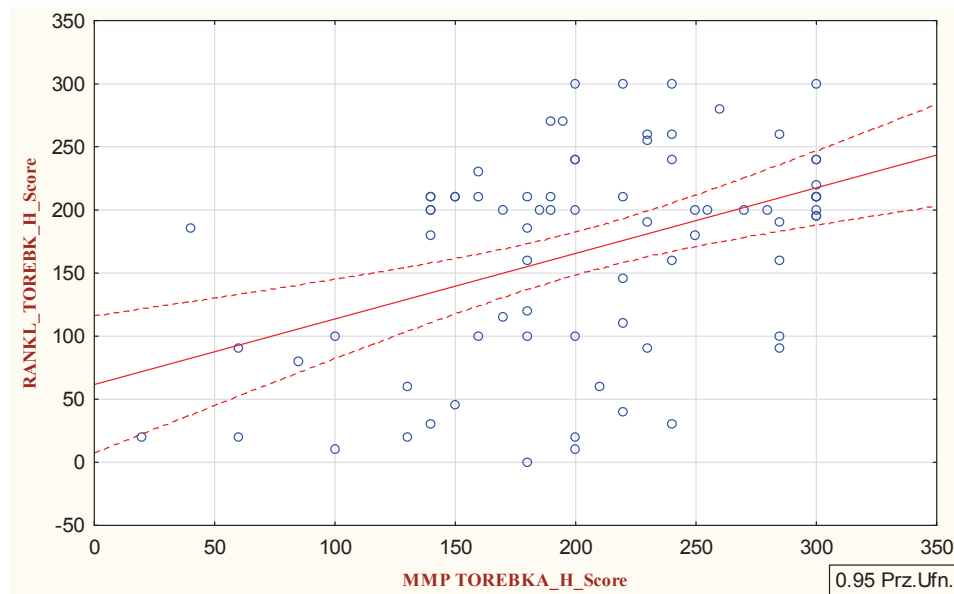
*Figure 28. Positive correlation between expression of RANKL in stroma and expression of OPG in stroma in all analysed lesions;  $N=82$ , ( $p=0.014$ ;  $r=0.3$ )*

W całej badanej grupie stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją MMP-9 w nabłonku a ekspresją OPG w nabłonku ( $p<0,033$ ;  $r=0,2$ ) (ryc. 29), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją RANKL w torebce ( $p<0,001$ ;  $r=0,4$ ) (ryc. 30), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją OPG w torebce ( $p<0,003$ ;  $r=0,3$ ) (ryc. 31), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją OPG w nabłonku ( $p<0,004$ ;  $r=0,6$ ) (ryc. 32).



Rycina 29. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MMP-9 w nabłonku i OPG w nabłonku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82 ( $p=0,033$ ;  $r=0,2$ )

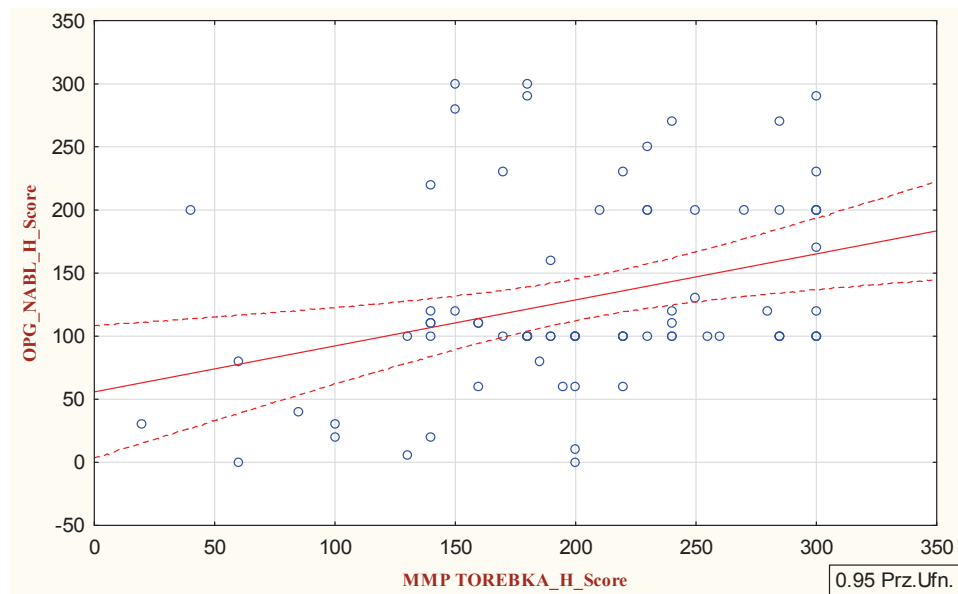
Figure 29. Positive correlation between expression of MMP-9 in epithelium and expression of OPG in epithelium in all analysed lesions; N=82 ( $p=0.033$ ;  $r=0.2$ )



Rycina 30. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MMP-9 w podścielisku i RANKL w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82 ( $p=0,001$ ;  $r=0,4$ )

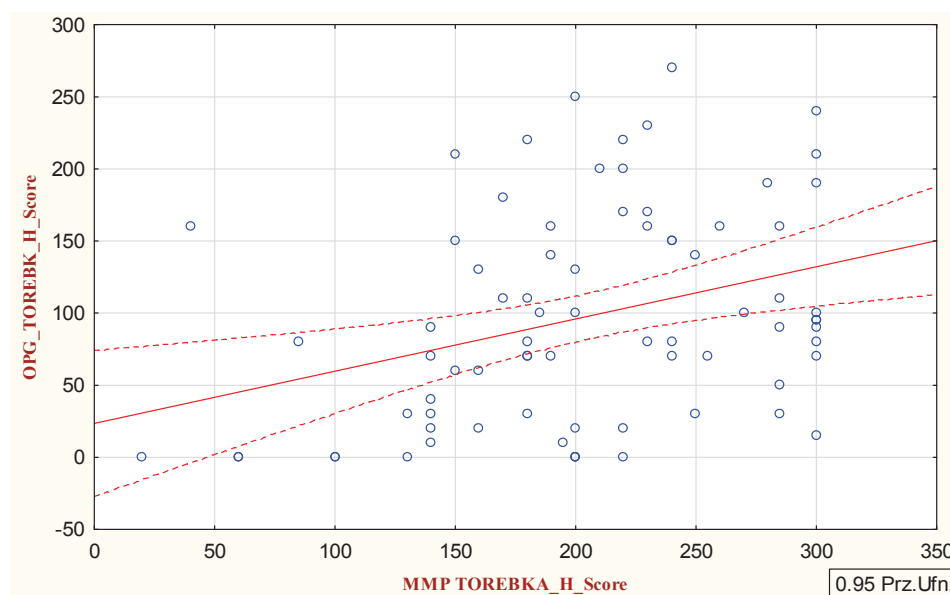
*Figure 30. Positive correlation between expression of MMP-9 in stroma and expression of RANKL in stroma in all analysed lesions; N=82 ( $p=0.001$ ;  $r=0.4$ )*





Rycina 31. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MMP-9 w podścielisku i OPG w nabłonku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82 ( $p=0,004$ ;  $r=0,3$ )

Figure 31. Positive correlation between expression of MMP-9 in stroma and expression of RANKL in stroma in all analysed lesions; N=82 ( $p=0.004$ ;  $r=0.3$ )



Rycina 32. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją MMP-9 w podścielisku i OPG w podścielisku we wszystkich badanych zmianach chorobowych; N=82 ( $p=0,003$ ;  $r=0,3$ )

Figure 32. Positive correlation between expression of MMP-9 in stroma and expression of OPG in stroma in all analysed lesions; N=82 ( $p=0.003$ ;  $r=0.3$ )

#### 4.2.10. Korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i MMP-9 w torbielach korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach (wewnątrzgrupowe)

Poziom białka RANKL w nabłonku dodatnio korelował z poziomem RANKL w torebce w grupie torbieli korzeniowych ( $p<0,031$ ;  $r=0,4$ ), rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych ( $p<0,001$ ;  $r=0,6$ ) i szkliwiakach ( $p<0,001$ ;  $r=0,8$ ). Najsilniejszy związek ten był w szkliwiakach.

Ekspresja MMP-9 w torebce pozytywnie korelowała z ekspresją OPG w torebce w grupie torbieli korzeniowych ( $p<0,012$ ), a siła związku była umiarkowana ( $r=0,5$ ).

Dla rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego wykazano dodatnie korelacje: pomiędzy poziomem RANKL w nabłonku a poziomem OPG w nabłonku ( $p < 0,044$ ;  $r = 0,4$ ), pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a w torebce ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,6$ ), pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a poziomem OPG w nabłonku ( $p < 0,031$ ;  $r = 0,4$ ), pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a poziomem RANKL w torebce ( $p < 0,003$ ;  $r = 0,6$ ).

Ponadto wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją OPG w nabłonku i w torebce w grupie rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych ( $p < 0,005$ ) i szkliwiakach ( $p < 0,001$ ), współczynnik korelacji wynosił odpowiednio 0,5 i 0,8. W szkliwiaku ta korelacja była silniejsza.

Może to sugerować, że ekspresja RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym. Ponadto poziom białek RANKL i OPG może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i OPG w osteolizie kości. Może to sugerować, że ekspresja MMP-9 i RANKL jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym. Ponadto poziom białek MMP9 i RANKL może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i MMP-9 w osteolizie kości. Może to sugerować, że ekspresja MMP-9 i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym. Ponadto poziom białek MMP9 i OPG może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno OPG jak i MMP-9 w osteolizie kości.

## 5. DYSKUSJA

Rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny jest jednym z najczęstszych nowotworów zębopochodnych i wymaga specjalnej uwagi z powodu agresywnego zachowania biologicznego oraz tendencji do wznów [114, 149, 218]. Zainteresowanie klinicystów szkliwiakiem powstało w związku z jego agresywnym przebiegiem klinicznym, występowaniem różnych typów morfologicznych oraz wysokim odsetkiem nawrotów. Z kolei torbiele są najczęstszą zmianą patologiczną rozwijającą się w kości szczęki i żuchwy. Pomimo, iż szkliwiak jest klasyfikowany jako łagodny nowotwór, jest on lokalnie inwazyjnym, wysoce destrukcyjnym guzem kości żuchwy i szczęki, nawet po radykalnym leczeniu chirurgicznym. Szkliwiak i jego mechanizmy inwazyjne od dawna zwracały uwagę wielu badaczy, pomimo to szczegółowe mechanizmy progresji guza, jak również onkogeneza i różnicowanie komórkowe pozostają nadal nieznanymi. Jednakże, ze względu na specyficzne miejsce powstawania szkliwiaka, można uważać, iż jego inwazyjne zachowanie jest ściśle związane z resorpcją otaczającej kości. Dlatego pomimo wielu badań dotyczących mechanizmów inwazji guza, skupiono się w niniejszej pracy na mechanizmie resorpcji kości w szkliwiaku, ale także w innych guzach: rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i torbielach zębopochodnych.

RANKL/RANK/OPG jest najważniejszym układem regulującym osteoklasty [34, 95]. Czynniki RANKL odgrywa istotną rolę w różnicowaniu, migracji, aktywacji i przeżyciu osteoklastów poprzez wiązanie się do receptora RANK na osteoklastach lub komórkach progenitorowych osteoklastów [30]. Natomiast OPG jest czynnikiem hamującym osteoklastogenezę. Jeśli OPG wiąże się z RANKL jako receptor pułapka to wówczas zmniejsza się interakcja pomiędzy RANKL i RANK [112, 225]. Wiele doniesień potwierdza to założenie, iż stosunek RANKL/OPG jest główną determinantą masy kostnej [94, 212]. Dużo badań wykazało, iż układ RANKL/RANK/OPG jest związany z różnymi osteodestrukcyjnymi patologiami, jak osteoporoza, zapalenie stawów, guzy kości, zapalenie przyzębia [9, 157, 199, 222]. Ostatnio, niektórzy badacze donoszą, iż podwyższona ekspresja RANKL, OPG i MMP-9 była stwierdzona w szkliwiakach, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i torbielach zębopochodnych [123, 170, 204, 211, 219, 262]. Obecność RANKL również wykazano w wapniejącym nabłonkowym guzie zębopochodnym, pseudogruczołowym guzie zę-

bopochodnym, torbielach korzeniowych i zawiązkowych oraz ziarniniakach okołowierzchołkowych [68, 81, 150, 151, 250].

Nicolin i wsp. [168] donieśli o indukowanej spontanicznej osteoklastogenezie poprzez szlak zależny od RANKL. Qian i Huang [189] sugerowali, że komórki szkliwiaka indukują tworzenie komórek osteoklastopodobnych. Obecność OPG i RANKL po raz pierwszy została stwierdzona w odontoblastach, ameloblastach, liniach komórek miazgi oraz w komórkach ozębnej [108, 192, 206]. Zauważono, że kilka czynników zapalnych, poprzednio identyfikowanych w szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych [122], może odgrywać rolę w regulacji układu RANKL/RANK/OPG. Co więcej inne czynniki jak np. wzrost ciśnienia (wewnątrz torbieli), mogą również wpływać na układ RANKL/OPG [131, 139, 172, 213].

Inne badania informują o różnych rolach układu RANKL/RANK/OPG nie tylko w resorpcji kości. Wskazują, że interakcje pomiędzy członkami rodziny czynnika martwicy nowotworów – TNF i ich specyficznymi receptorami wpływają na kilka funkcji, włączając w to regulację komórek immunologicznych [7, 175, 228], hamowanie apoptozy [210], dodatkowe różnicowanie i proliferację komórek nabłonkowych sutka [82]. Jest możliwe, że RANKL wywodzący się z nabłonka ma wpływ na wzrost guza poprzez wpływ na resorpcję kostną, proliferację komórek lub opóźnianie apoptozy. Dlatego te aspekty powinny być również przebadane w guzach zębopochodnych.

W obecnym badaniu założono, iż układ RANKL/RANK/OPG i MMP-9 biorą udział w procesie resorpcji kostnej szkliwiaka, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i torbieli zębopochodnych oraz odgrywają podstawową rolę w progresji tych guzów.

W niniejszej pracy oceniano ekspresję RANKL i OPG, IL1- $\alpha$  i MMP-9 oraz stosunek RANKL/OPG w nowotworach i torbielach zębopochodnych metodą Western Blot i immunohistochemiczną. Wykonano analizę czynnikową i stwierdzono, że w badanej grupie chorych płeć, wiek, lokalizacja i choroby towarzyszące nie wpływały istotnie na RANKL, OPG, MMP-9 oraz IL-1 $\alpha$  ( $p > 0,5$ ). Wykazano różnice w ekspresji tych czynników pomiędzy badanymi zmianami zębopochodnymi a grupą kontrolną, którą stanowiły mieszki zębowe pobrane od zdrowych pacjentów w czasie zabiegu dłutowania całkowicie zatrzymanego dolnego trzeciego zęba trzonowego z przyczyn ortodontycznych. Zaobserwowano istotnie niższą zawartość RANKL w mieszkach zębowych ( $p < 0,002$ ). Wyższa ekspresja RANKL w szkliwiaku, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębo-

pochodnym oraz torbieli korzeniowej i zawiązkowej wskazuje na aktywację osteoklastów przez RANKL jako ważny mechanizm, który wywołuje osteolizę kości w tych zmianach chorobowych. Natomiast w poziomie OPG nie było znamienych różnic pomiędzy zmianami zębopochodnymi a grupą kontrolną. W rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym ekspresja OPG była statystycznie znamienne niższa niż w grupie mieszków zębowych ( $p < 0,012$ ). Wskazuje to na wzrost agresywności guza lub obniżenie reakcji obronnej na resorpcję kości. OPG, która hamuje indukowaną przez komórki rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego osteoklastogenezę i resorpcję kości, w przyszłości prawdopodobnie będzie mogła być zastosowana do leczenia guzów zębopochodnych. Stosunek RANKL/OPG w badanych zmianach chorobowych był znamienne wyższy niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Wysoki stosunek RANKL/OPG może wskazywać na wzrost destrukcji kości.

Da Silva i wsp. [52] zauważyli niższą zawartość zarówno RANKL jak i OPG w mieszkach zębowych. Kumamoto i wsp. [123] wykazali wyższą ekspresję RANKL w zawiązkach zębowych w porównaniu ze szkliwiakami.

Przeprowadzone badania wykazały różnicę w ekspresji RANKL i OPG w szkliwiakach, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym oraz w torbielach zawiązkowych i korzeniowych. Stwierdzono znamienne wyższą ekspresję OPG w torbielach korzeniowych niż rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym ( $p < 0,050$ ). Obniżony poziom OPG w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym może świadczyć o większej agresywności zmiany niż torbieli korzeniowej. Nie wykazano znamienych różnic w ekspresji RANKL ani stosunku RANKL/OPG w metodzie Western Blot pomiędzy torbielą korzeniową, zawiązkową, rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym i szkliwiakiem. Natomiast w przypadku połączonej grupy nowotworów zębopochodnych (rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny + szkliwiak) ekspresja RANKL była istotnie większa w torbielach zębopochodnych ( $p < 0,025$ ). Poziom ekspresji OPG był znamienne wyższy w torbielach korzeniowych niż w grupie nowotworów zębopochodnych ( $p < 0,013$ ). Wyniki tych badań mogą sugerować, iż wyższy poziom OPG może świadczyć o mechanizmie obronnym organizmu przed destrukcją kości. Zatem można przypuszczać, że OPG, która hamuje osteoklastogenezę wywołaną przez komórki nowotworów zębopochodnych i resorpcję kości, prawdopodobnie może być użyta do terapeutycznego zastosowania w leczeniu szkliwiaka. Co więcej, blokada przez OPG ścieżek sygnałowych regulujących różnicowanie i aktywację może stać się naj-

bardziej obiecującym celem dla leczenia. W wykonanych badaniach stwierdzono również istotnie niższą zawartość IL-1 $\alpha$  w mieszkach zębowych niż w badanych zmianach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ). Wyższa ekspresja IL-1 $\alpha$  (cytokiny prozapalnej) w torbielach korzeniowych i zawiązkowych, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym oraz w szkliwiakach wskazuje, że IL-1 $\alpha$  stymuluje resorpcje kostną poprzez podwyższenie poziomu RANKL. Jak wykazano IL-1 $\alpha$  m.in. jest produkowana przez rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny i torbiel korzeniową [155] oraz komórki gwiaździste w szkliwiaku [96]. W niniejszej pracy wykazano znamienne wyższy poziom IL-1 $\alpha$  w torbieli korzeniowej w porównaniu do torbieli zawiązkowej ( $p < 0,050$ ). Ponadto stwierdzono istotnie wyższą ekspresję IL-1 $\alpha$  w torbielach korzeniowych niż w grupie nowotworów zębopochodnych ( $p < 0,008$ ). Świadczyć to może, że proces zapalny, wywołany przez zakażenia bakteryjne w torbieli korzeniowej posiada silniejszy potencjał do osteolizy niż w nowotworach zębopochodnych.

Wykazano wzajemne statystycznie zależne korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  w torbieli korzeniowej i zawiązkowej, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym oraz szkliwiaku. Wykazano silną i znamienne korelację pomiędzy ekspresją RANKL i OPG w badanych nowotworach i torbielach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,7$ ). Może to sugerować, że poziom RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężony. Świadczyć to może o próbie obrony organizmu przed nadmierną, patologiczną utratą kości. Ponadto stwierdzono, że ekspresja RANKL dodatnio koreluje z ekspresją IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,5$ ). Także zauważono, że poziom OPG związany jest z poziomem IL-1 $\alpha$  w zmianach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,4$ ). IL-1 $\alpha$  może być jednym z czynników, który zwiększa poziom zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu resorpcji kości.

W torbielach korzeniowych wykazano wzajemne i istotne korelacje pomiędzy RANKL i OPG, RANKL i IL-1 $\alpha$  oraz OPG i IL-1 $\alpha$ . Gdy wzrasta poziom RANKL to rośnie poziom OPG w torbielach korzeniowych, a siła związku jest znaczna ( $p < 0,016$ ,  $r = 0,7$ ). Może być to związane z reakcją obronną organizmu na proces lizy kości. Ponadto gdy rośnie poziom RANKL to wzrasta poziom IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,002$ ,  $r = 0,4$ ). Stwierdzono również, że gdy wzrasta poziom IL-1 $\alpha$  to rośnie poziom OPG ( $p < 0,016$ ,  $r = 0,3$ ).

Analizując wielkość ubytku kostnego w przebiegu zmian zębopochodnych stwierdzono, że w przypadku rozległych nowotworów zębopochodnych (przekraczających 3 cm średnicy) występuje znamienne wzrost ekspresji RANKL

( $p < 0,012$ ). Zależność ta jest istotna tylko dla nowotworów zębopochodnych, natomiast dla torbieli zębopochodnych nie ma związku pomiędzy ekspresją RANKL a wielkością zmiany. Można przypuszczać, że zwiększonej ekspresji RANKL w nowotworach zębopochodnych towarzyszy większa osteoliza kości.

W badaniu immunohistochemicznym obecność RANKL i OPG stwierdzono w cytoplazmie komórek nabłonka i podścieliska, niemal we wszystkich subpopulacjach komórek w torbielach korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach. Wyniki niniejszych badań wskazują, że nowotworowy i nienowotworowy zębopochodny nabłonek oraz podścielisko guza działają jako źródło RANKL i OPG. Wykrycie silnej ekspresji RANKL we wszystkich próbkach prowadzi do stwierdzenia, iż odgrywa on podstawową rolę w rozwoju i progresji guzów zębopochodnych.

Badanie immunohistochemiczne nie wykazało znamienych różnic w ekspresji czynnika RANKL w komórkach nabłonka torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka. W komórkach podścieliska wykazano istotnie niższy poziom RANKL w szkliwiaku niż w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i torbieli korzeniowej ( $p < 0,001$ ). Ponadto stwierdzono znamieny wzrost ekspresji RANKL w komórkach podścieliska w torbieli korzeniowej w porównaniu do rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego ( $p < 0,038$ ).

Wykazano istotnie wyższą ekspresję OPG zarówno w komórkach nabłonka ( $p < 0,001$ ), jak i podścieliska rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego ( $p < 0,038$ ) w stosunku do szkliwiaka. Może to świadczyć, o większej miejscowej agresji szkliwiaka.

Biorąc pod uwagę wzmoczoną ekspresję RANKL w zmianach o charakterze rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego, prowadzącą do resorpcji okolicznych struktur kostnych, występowanie wyższej ekspresji OPG w badanym materiale tkankowym może świadczyć o próbie obrony organizmu przed nadmierną, patologiczną utratą kości. Znaczna przewaga ekspresji RANKL nad OPG prowadzi do aktywacji osteoklastów i resorpcji kości.

Da Silva i wsp. [52] nie stwierdzili różnic w ekspresji RANKL i OPG w nabłonku rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego, szkliwiaka, torbieli korzeniowej i zawiązkowej, a w podścielisku zaobserwował wyższą ekspresję RANKL w szkliwiaku niż rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym.

Tay i wsp. [240] i Tekkesin i wsp. [242] nie zauważyli różnic w ekspresji RANKL w nabłonku i w podścielisku pomiędzy torbielą korzeniową, rogowa-



ciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnymi szkliwiakiem. Natomiast Tekkesin i wsp. [242] stwierdził wyższą ekspresję OPG w torbieli korzeniowej w porównaniu do rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego. De Moraes i wsp. [58, 59] nie zaobserwował różnic w ekspresji RANKL w nabłonku pomiędzy torbielą z zawiązkową a korzeniową, natomiast stwierdził wzrost ekspresji RANKL w podścielisku w torbieli zawiązkowej w porównaniu do torbieli korzeniowej. Różnice w wynikach mogą być spowodowane zastosowaniem innej metody oceny ilościowej ekspresji RANKL i OPG.

Porównano stopień ekspresji (słaby, średni, silny) RANKL i OPG pomiędzy torbielą korzeniową, rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym i szkliwiakiem.

Silną ekspresję białka RANKL w nabłonku stwierdzono we wszystkich przypadkach torbieli korzeniowej, w 90,63% rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i w 78,26% szkliwiaka, a średnią w 6,25% rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i w 13,04% szkliwiaka. W badanych zmianach zębopochodnych wykazano również wysoką ekspresję RANKL w podścielisku u 76,83%, średnią, u 7,32% i niską u 14,63%. Wysoki poziom ekspresji RANKL w podścielisku stwierdzono przede wszystkim w torbielach korzeniowych (92,59%), średni i niski w komórkach podścieliska szkliwiaka (34,78%). Zmiany o charakterze rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego wykazywały ekspresję RANKL w podścielisku głównie na wysokim poziomie (75,00%).

W badanych zmianach zębopochodnych ekspresja OPG była istotnie różna pomiędzy badanymi zmianami zarówno w nabłonku ( $p < 0,001$ ) jak i podścielisku ( $p < 0,010$ ). Wszystkie zmiany o charakterze torbieli korzeniowej znamienne częściej wykazywały ekspresję OPG w nabłonku na wysokim (92,59%) lub średnim (7,41%) poziomie. W rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym stwierdzano istotnie częściej silną ekspresję OPG w nabłonku (90,63%). Niską ekspresję białka OPG wykazano w 6 przypadkach szkliwiaka (27,27%), a w 3 nie stwierdzono ekspresji w nabłonku.

Wysoki poziom OPG w podścielisku wykazano głównie w torbieli korzeniowej i rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym. Natomiast w szkliwiaku stwierdzano najczęściej brak ekspresji OPG w podścielisku lub niski poziom. Wyższe poziomy OPG mogą odzwierciedlać mechanizm homeostaticzny szkieletu, aby powstrzymać zwiększoną resorpcję kości [76, 77, 83, 111].

W ten sposób wykazano nieprawidłową regulację układu RANK/RANKL/OPG w nowotworowych i nienowotworowych zmianach zębopochodnych, w których wzmożona ekspresja RANKL lub obniżony poziom OPG grają ważną rolę w destrukcji kości związanej z guzem. Zbadanie mechanizmu resorpcji kostnej w szkliwiaku pomoże dalszemu zrozumieniu biologicznego zachowania się guza i dostarczy kierunków do leczenia klinicznego.

RANKL uczestniczył w resorpcji kostnej wywołanej przez szkliwiaka, i odgrywał podstawową rolę w osteoklastogenezie wywołanej przez komórki szkliwiaka. Szkliwiaki mogą wpływać na osteoklastogenezę i resorpcję kości, co dostarcza przestrzeni do ich wzrostu w kości. Sandra i wsp. [210] wykazał, że OPG jest dobrze wyrażony w tkankach szkliwiaka oraz komórkach AM-1. Qian i Huang [189] stwierdzili, że OPG hamowało zarówno osteoklastogenezę indukowaną przez komórki szkliwiaka oraz resorpcję kości wywołaną przez osteoklasty. Blokowanie szlaków sygnałowych regulujących różnicowanie osteoklasta oraz aktywacja OPG może być najbardziej obiecującym kierunkiem leczenia. Ostatnie badania sugerują, iż OPG może być nowym czynnikiem terapeutycznym dla niektórych chorób z utratą kostną, jak osteoporoza i reumatoidalne zapalenie stawów [8, 137, 193]. Ponieważ OPG znacząco hamuje indukcję osteoklastogenezy w szkliwiaku, pośrednio może być użytecznym receptorem w hamowaniu wzrostu szkliwiaka. OPG mogła by być wykorzystana do celów terapeutycznych w przyszłości.

Porównano również stopień wybarwienia nabłonka do podścieliska. W każdym przypadku torbieli korzeniowej i rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego oraz szkliwiaka obserwowano, że ekspresja OPG była wyższa w nabłonku niż w torebce. Ekspresja RANKL była wyższa w nabłonku niż podścielisku w torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i szkliwiaku.

Z kolei analiza stosunku komórek RANKL-dodatnich i OPG-dodatnich w nabłonku i podścielisku wykazała, że najczęściej w nabłonku torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka ekspresja RANKL była równa ekspresji OPG ( $p < 0,001$ ). Tylko w przypadku szkliwiaka stwierdzono, że w komórkach podścieliska ekspresja RANKL była istotnie większa od ekspresji OPG ( $\text{RANKL} > \text{OPG}$ ) ( $p < 0,001$ ). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, iż szkliwiaki produkują więcej RANKL niż OPG *in vitro* [208]. Świadczyć to może o większej agresywności guza. Można założyć, że próbki z grupy  $\text{RANKL} > \text{OPG}$  są związane z aktywną resorpcją kości, pod-

czas gdy grupa RANKL<OPG wykazuje minimalną aktywność resorpcyjną, a podobne poziomy RANKL i OPG mogą być związane z homeostazą tkankowego „obrotu”, gdzie tworzenie i resorpcja kości jest w równowadze. W oparciu o sposoby ekspresji RANKL/OPG w różnych fizjologicznych oraz patologicznych warunkach [67, 77, 78, 104] można sugerować, iż miejsca z aktywną resorpcją kostną przedstawiają różny sposób ekspresji RANKL i OPG w porównaniu do miejsc gdzie resorpcja jest nieobecna lub minimalna. Próbkami gdzie ekspresja RANKL przeważa (grupa RANKL>OPG) są przypuszczalnie progresywne zmiany, podczas gdy próbki z grup gdzie ekspresja RANKL i OPG jest podobna (RANKL=OPG) lub gdzie dominuje OPG (RANKL<OPG) są potencjalnie stabilnymi zmianami.

Natomiast da Silva i wsp. [52] stwierdzili w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym więcej OPG-dodatnich niż RANKL-dodatnich komórek. Rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodnym i szkliwiaki wykazały podobne ilości OPG-dodatnich komórek. Z drugiej strony wyniki obecnej pracy nie zgadzają się z badaniami Kumamoto i wsp. [123]. Stwierdzili oni tendencję do większej zawartości OPG-dodatnich niż RANKL-dodatnich immunowybarwionych komórek, szczególnie w komórkach szkliwiaka. Przyczyny tej rozbieżności pomiędzy wynikami nie są znane. Być może, iż jest to spowodowane zastosowaniem innej metody oceny ilościowej ekspresji RANKL i OPG.

W niniejszej pracy, ekspresja RANKL i OPG była obecna w komórkach nabłonka i podścieliska szkliwiaka i rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i torbieli korzeniowej. Stwierdzono wyraźny związek sposobów ekspresji RANKL i OPG w różnych miejscach remodelingu kostnego. Jednakże, niezależnie od ilościowej oceny ekspresji RANKL i OPG oraz ograniczeń związanych z określeniem względnych wartości ekspresji genu na poziomie białka, stwierdzono wyraźny związek sposobów ekspresji RANKL i OPG w różnych miejscach remodelingu kości. Podkreśla to istotne znaczenie biologiczne układu RANKL/RANK/OPG i jest zgodne z wynikami wcześniejszych badań [26, 67, 77, 78, 83, 111].

Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności między ekspresją RANKL i OPG a wielkością zmiany chorobowej w badaniu immunohistochemicznym.

Da Silva i wsp. [52] stwierdzili, że pomimo różnic w obrazie radiologicznym porównując rogowaciejąco-torbielowate guzy zębopochodne i szkliwiaki, nie było statystycznej korelacji pomiędzy zmianami radiologicznymi a ekspresją RANKL i OPG.

Analiza statystyczna nie wykazała znamiennych różnic w poziomie RANKL i OPG w nabłonku i w podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków. Porównując tylko szkliwiaka litego z jednokomorowym (wyłączając przypadek szkliwiaka obwodowego) nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w ekspresji RANKL i OPG w nabłonku i podścielisku pomiędzy tymi nowotworami.

Reasumując zauważono, że guzy zębopochodne przedstawiają zróżnicowane sposoby ekspresji RANKL i OPG. Możliwe, iż sposób ekspresji RANKL i OPG może być związany ze stabilną lub progresywną naturą guzów zębopochodnych. Wiedza ta może dostarczyć ważnych danych do rozwoju diagnostyki, strategii prewencji oraz leczenia. Może to poprawić postępowanie kliniczne w guzach zębopochodnych. Obecnie chirurgia, która jest terapią z wyboru dla szkliwiaków i rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych, powinna występować w skojarzeniu z leczeniem uzupełniającym. W celu uzyskania lepszych wyników leczenia z mniejszą ilością wznów po zabiegach można by było zastosować leki zmniejszające osteolizę kości (np. denosumab).

W powyższej pracy wykazano, iż guzy zębopochodne, które wykazują różne rodzaje resorpcji kości, wykazują różnice w ekspresji RANK, RANKL i OPG. Wyniki te mogą być użyteczne w rozróżnianiu aktywnych i nieaktywnych postaci – etapów wzrostu guza oraz w ingerencji terapeutycznej w osteolizie kości. Równowagę pomiędzy RANKL i OPG w szkliwiakach i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych można rozważać jako możliwy determinant progresji komórek guza.

Identyfikacja RANKL jako mediatora osteoklastogenezy w szkliwiakach, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych, torbielach zawiązkowych i torbielach korzeniowych otwiera nowy obszar do zbadania co do biologii tych chorób. Fakt, iż RANKL jest wymagany do rozwoju osteoklasta sugeruje, iż czynniki, które hamują jego aktywność mogą być lecznicze. Jest możliwe, iż przeciwciała do RANKL, które obecnie badane są u myszy mogą być rozwinięte do użytku u ludzi. Alternatywnie, rozpuszczalny RANK i OPG, który hamuje tworzenie osteoklasta poprzez blokowanie interakcji RANKL-RANK, również posiada potencjał do rozwoju celem przyszłego zastosowania terapeutycznego.

Odkrycie i poznanie cech szlaków sygnałowych RANKL, RANK, OPG [129, 260] oraz określenie ich roli w patogenezie utraty kostnej [34, 214, 239] dostarczyło racjonalnych przesłanek dla rozwoju leków ze zdolnością do modulacji indukowanej przez RANK osteoklastogenezy [85]. Ingerencja na układ

RANKL/RANK/OPG przez podanie OPG powoduje anulowanie resorpcji kości w osteoporozie, szpiczaku mnogim [237].

Resorpcja kostna, wywołana głównie przez osteoklasty, powoduje usunięcie zarówno mineralnych jak i organicznych składników macierzy kostnej. W dodatku, degradacja podścieliska organicznego w kości jest głównie wywołana przez MMP i katepsynę [62, 245]. MMP są rodziną zależnych od cynku proteinaz pośredniczących w degradacji zewnątrzkomórkowego podścieliska i błony podstawnej. MMP-9 jest jedną z głównych proteaz, która uczestniczy w degradacji macierzy kostnej [229]. MMP-9 określana jest jako żelatynaza-B, z powodu jej zdolności do degradacji kolagenu typu IV oraz żelatyn. MMP-9 odgrywa ważną rolę w degradacji błony podstawnej dzięki swojej zdolności do degradacji kolagenu IV [62].

W obecnej pracy skupiono się na ocenie roli MMP-9 w resorpcji kości w nowotworach i torbielach zębopochodnych szczęki i żuchwy. W badaniu immunohistochemicznym ekspresję MMP-9 wykazano w cytoplazmie komórek nabłonka i podścieliska, niemal we wszystkich subpopulacjach komórek w torbielach korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach. Ekspresja MMP-9 widziana zarówno w nabłonku jak i w podścielisku tych zmian może być wyjaśniona przez fakt, iż białko to jest produkowane przez komórki nabłonkowe, fibroblasty, makrofagi, plazmocyty, limfocyty i neutrofile [88] oraz komórki guza [25]. Silna ekspresja MMP-9 wykryta w nabłonku i podścielisku może sugerować, iż MMP-9 może uczestniczyć w degradacji macierzy kości wywołanej przez rogowaciejąco-torbielowaty guz zębopochodny i szkliwiaka, a także torbiel korzeniową.

Inni autorzy opisali, że MMP-9 uczestniczy w resorpcji kostnej. Itoh i wsp. [103] stwierdzili, że MMP-9 była zaangażowana w proces destrukcji kostnej w reumatoidalnym zapaleniu stawów. W eksperymentalnym modelu przerzutów kostnych raka prostaty, zaobserwowano iż selektywne zahamowanie MMP-9 powoduje zmniejszenie degradacji kości [27].

We wszystkich badanych zmianach zarówno w nabłonku jak i podścielisku stwierdzono rozlaną ekspresję MMP-9. Sugeruje to rolę MMP-9 we wzroście guza, ponieważ białko to działa na przebudowę macierzy pozakomórkowej oraz na degradację macierzy kostnej [49, 63]. MMP-9 rozpuszcza kolagen typu IV oraz komponenty strukturalne błon podstawnych jako wstęp do inwazji. Wykryto, iż nieprawidłowa ekspresja MMP-9 jest związana z agresywnością w wielu guzach [145, 154]. Ekspresja MMP-9 w niniejszym badaniu była znaleziona w

podścielisku i komórkach guza tkanek szkliwiaka. To znalezisko jest w zgodności z wynikami Pinheiro i wsp. [186], ale odmienne z wynikami Kumamoto i wsp. [124].

Analiza obecnych wyników wykazała, że w rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach stwierdzano wysoką ekspresję MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska. Wyniki te sugerują wyższą degradację błony podstawnej w wyniku wyższej ekspresji MMP-9. Niektóre doniesienia z literatury wykazują, iż MMP-9 odgrywa ważną rolę w degradacji błony podstawnej na skutek jej zdolności do degradacji kolagenu IV [62].

Na podstawie tych obserwacji można sugerować, iż degradacja macierzy pozakomórkowej nie jest zależna od ekspresji pojedynczej MMP, ale raczej od złożonego działania kilku MMP oraz inhibitorów tkankowych TIMP [226].

Dla wszystkich zmian stwierdzono istotne różnice w zakresie H-score pomiędzy ekspresją MMP-9 w obrębie komórek nabłonka a podścieliska. Wykazano znamienne wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym w porównaniu do torbieli korzeniowej ( $p < 0,001$ ). Może to mieć związek z ekspansywnym wzrostem rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i znacznie silniejszą tendencją do wzrostu i niszczenia otaczającej kości niż w torbielach. Tłumaczy to bardziej agresywny charakter zmiany. Ponadto wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego był istotnie większy niż w komórkach nabłonka szkliwiaka ( $p < 0,001$ ). Stwierdzono znamienne wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach podścieliska torbieli korzeniowej w porównaniu do szkliwiaka ( $p < 0,001$ ). Niższa ekspresja MMP-9 w szkliwiakach niż w rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych może być spowodowana obecnością inhibitorów MMP-9. Kumamoto i wsp. [124] wykonali badanie immunohistochemiczne i wykazali, iż zwiększona ekspresja inhibitorów tkankowych TIMP-1 oraz TIMP-2 była związana ze słabą reaktywnością MMP-9. Według tych autorów, możliwe jest, iż TIMP powodują hamowanie progresji guza w szkliwiakach poprzez hamowanie aktywności MMP-9.

Porównano stopień ekspresji (słaby, średni, silny) MMP-9 pomiędzy torbielą korzeniową, rogowaciejąco-torbielowatym guzem zębopochodnym i szkliwiakiem. Zaobserwowano w 99,77% przypadków bardzo wysoką ekspresję MMP-9 w nabłonku badanych zmian. Tylko w 1 przypadku odnotowano stopień wybarwienia o średniej intensywności i dotyczył on torbieli korzeniowej. Również



wysoki poziom MMP-9 stwierdzono w komórkach podścieliska i odnotowano istotne różnice w ekspresji MMP-9 pomiędzy badanymi zmianami chorobowymi ( $p < 0,004$ ). Silną ekspresję MMP-9 w komórkach podścieliska wykazano w 75,00% wszystkich przypadków, w tym 21 torbielach zapalnych, 28 rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i 11 szkliwiakach. Średnią ekspresję w komórkach podścieliska MMP-9 zaobserwowano w 18,75%. Natomiast tylko w 1 przypadku (torbieli korzeniowej) nie stwierdzono ekspresji MMP-9 w podścielisku. Sugeruje to, iż na wzrost tych zmian ma wpływ wydzielanie MMP-9. Stąd bardziej nasilona ekspresja MMP-9 w analizowanych guzach zębopochodnych sugeruje możliwy udział tego białka w proliferacji oraz różnicowaniu komórek. Może to wyjaśnić większą resorpcję kości, wyższy potencjał inwazyjny oraz gorsze rokowanie w porównaniu z torbielą korzeniową [72].

Natomiast Henriques i wsp. [91] stwierdzili znacznie wyższe procentowe wybarwienie MMP-9 w nabłonku i podścielisku rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka niż torbieli korzeniowej, z wynikiem wybarwienia  $>50\%$  obserwowanym odpowiednio w 90% i 95%.

W obecnym badaniu porównano również stopień wybarwienia nabłonka do podścieliska. W przypadku ekspresji MMP-9 ekspresja w obrębie nabłonka i podścieliska była równie wysoka.

Ekspresja MMP-9 była oceniana w różnych guzach. W dodatku również doniesiono, iż MMP-9 jest ściśle związana z właściwościami inwazyjnymi różnych guzów [62]. Wykazano istnienie związku z inwazyjnym fenotypem oraz zdolnością komórek guza do dawania przerzutów [66, 253]. Badania przedkliniczne wykazały, iż raki płaskonabłonkowe wykazują wyższy poziom ekspresji MMP in vivo oraz inhibicja tych enzymów in vitro w modelach zwierzęcych redukuje potencjał inwazyjny oraz zdolność do dawania przerzutów odległych [202].

Jednakże spotykane są różne opinie dotyczące roli MMP-9 w resorpcji kości. Na przykład, Fuller i wsp. [75] sugerowali, iż MMP-9 w większości ma mały wkład w aktywność osteoklastów. Jednakże Kanno i wsp. [107] donieśli, iż MMP-9 może odgrywać główną rolę w resorpcji kości wywołanej przez osteoklasty. Podobnie Qian i Huang [189] zaobserwował silny wzrost ekspresji MMP-9 w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i szkliwiaku, a mniej intensywny w torbieli korzeniowej.

Ekspresja MMP-9 była wykryta zarówno w komórkach podścieliska jak i w komórkach guza w szkliwiaku, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym i torbieli korzeniowej. Kumamoto uważa, że ekspresja MMP-9 jest

związana z interakcjami pomiędzy komórkami nabłonka a podścieliska w zdrowych i nowotworowych tkankach zębopochodnych. Częsteczki te mogą grać rolę w regulacji progresji guza w szkliwiakach, jak również jako regulacja procesu rozwojowego zawiązków zębowych. Ekspresja MMP-9 była wykryta przez innych badaczy zarówno w komórkach podścieliska jak i w komórkach guza w różnych nowotworach złośliwych na poziomie transkrypcji genu i produktu [41, 142, 158, 198]. W naszym badaniu, również ekspresja MMP-9 była znaleziona w komórkach guza i podścieliska. Co sugeruje, iż potencjał progresji w szkliwiakach jest duży. Jednakże, reaktywność MMP-9 w komórkach podścieliska szkliwiaka była znacząca mocniejsza niż w torbieli korzeniowej, wskazując na wzmożoną produkcję MMP-9 na skutek przemiany nowotworowej zębopochodnych tkanek.

Według de Vicente i wsp. [61] MMP-9 jest zaangażowana w angiogenezę oraz wzrost guza. Angiogeneza jest kluczowym czynnikiem inwazji guzów. Fakt ten sugeruje związek tej żelatynazy z agresywnym zachowaniem oraz nieprzewidywalnym przebiegiem klinicznym niektórych nowotworów. Podobnie do niniejszego badania, Silveira i wsp. [223] oraz de Andrade Santos i wsp. [56] obserwowali bardziej wyrażoną ekspresję MMP-9 w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym w porównaniu do torbieli korzeniowej. Wspiera to hipotezę większej agresywności tego guza w porównaniu z innymi torbielami. W badaniu Kumamoto i wsp. [124] immunoreaktywność dla MMP-9 była wyższa w podścielisku szkliwiaków niż w zawiązkach zębów. Sugeruje to, iż zwiększona produkcja tego białka przez komórki nowotworowe jest związana z transformacją zębopochodnych tkanek oraz agresywnością tego guza. Ribeiro i wsp. [197] również wykazali intensywne immunowybarwienie dla tej żelatynazy w nabłonku oraz podścielisku szkliwiaków. Wskazuje to na możliwy udział MMP-9 we wzroście tych guzów.

Nagase i wsp. [164] oraz Verma i Hansch [249] wykazali, iż ekspresja MMP w zdrowych tkankach jest słaba. Podczas gdy wysoka ekspresja tych białek jest obserwowana w tkankach nowotworowych. W obecnym badaniu, wysoki odsetek oraz rozlaną ekspresję MMP-9 obserwowano w komórkach nabłonkowych oraz podścielisku rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego, torbieli korzeniowej i w szkliwiakach. Henriques i wsp. [91] wykazali również wysoki odsetek i rozlaną ekspresję w nabłonku i podścielisku torbieli korzeniowej i rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego, ale w szkliwiakach zauważyli ogniskowe wybarwienie. Możliwym jest, iż wskazywało to na mniejszą



sekrecję tego białka, które hamuje aktywność MMP-9. Podobnie, odsetek wybarwienia był mniej wyrażony w komponentach nabłonkowych i podścielisku szkliwiaka w porównaniu z innymi zmianami. Sugeruje to wyższą produkcję MMP-9 i zwiększoną degradację i w konsekwencji tego wyższy potencjał inwazyjny tego guza. Uważa się, iż TIMP-2 hamuje inwazję guza przez hamowanie MMP-9 [98, 196]. Podsumowując powyższe dane, badania te sugerują, iż wyższa ekspresja MMP-9 w szkliwiakach mogłaby być wskaźnikiem większej agresywności tego guza w porównaniu z innymi badanymi zmianami.

Ocena ekspresji MMP-9 może przyczynić się do zwiększenia wiedzy o różnych właściwościach biologicznych i przebiegu klinicznym zmian zębopochodnych. Białka macierzy pozakomórkowej były wykryte w kilku zębopochodnych torbielach i guzach [60, 166, 188]. Macierz pozakomórkowa działa jako bariera ochronna blokująca inwazję oraz tworzenie przerzutów guza. Degradacja macierzy pozakomórkowej stanowi krytyczny krok w procesie inwazji oraz tworzenia przerzutów przez komórki raka. Liczne białka, w tym degradujące macierz pozakomórkową enzymy, czynniki wzrostu, cytokiny są zaangażowane w proces przekraczania granic tkankowych przez komórki raka.

Produkcja MMP-9 przez komórki guza może stanowić „preinwazyjną niszę” [110], która jest związana z inwazyjnością szkliwiaka. Hipotezę tą potwierdza również obecność regionów srebrochłonnych organizatorów jąderkowych (AgNOR – *argyrophilic nucleolar organiser*) [186], które sugerują, iż komórki szkliwiaka syntetyzują rozpuszczalne czynniki wzrostu i cytokiny, które konstruują mikrośrodowisko dla nowotworowej infiltracji do kości szczęki i żuchwy. MMP-9 może być jednym z czynników dających wkład w miejscowe agresywne zachowanie szkliwiaka.

W niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnej zależności między ekspresją MMP-9 a wielkością zmiany chorobowej w badaniu immunohistochemicznym.

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków. Również porównując tylko szkliwiaka litego z jednokomorowym (wyłączając przypadek szkliwiaka obwodowego) nie wykazano statystycznie znamienych różnic w ekspresji MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy tymi nowotworami. Może to być spowodowane małą liczebnością grupy szkliwiaków jednokomorowych. Nowotwory te są bardzo rzadkie i można by było stworzyć uniwersalną ankietę rejestracji nowotworów zębopochodnych, którą mogłyby wypełniać różne ośrodki leczące chorych z tymi nowotworami. Finkelstein i wsp. [70] zaproponowali

ankietę stanowiącą narzędzie do oceny wyników leczenia. Zaproponowany formularz może być zalecany w celu umożliwienia porównywania leczenia w ocenie retrospektywnej lub prospektywnej.

Wykazano istotne zależności pomiędzy poziomami badanych metodą immunohistochemiczną białek. Stwierdzono korelację pomiędzy ekspresją RANKL, OPG i MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska w całej grupie badanej.

W całej grupie badanej wykazano dodatnie korelacje pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku i w torebce ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,5$ ), RANKL w nabłonku i w torebce ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,4$ ), OPG w nabłonku i w torebce ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,6$ ). Interakcje nabłonek a podścielisko mogą być ważne dla równowagi pomiędzy poziomami RANKL i OPG, MMP-9 w szkliwiakach, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i torbielach korzeniowych.

Ponadto w całej badanej grupie stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją MMP-9 w nabłonku i ekspresją OPG w nabłonku, ekspresją MMP-9 w torebce i ekspresją RANKL w torebce, ekspresją MMP-9 w torebce i ekspresją OPG w torebce, ekspresją MMP-9 w torebce i ekspresją OPG w nabłonku. Analiza korelacji sugeruje, że te molekuly mogą działać zespołowo.

W całej badanej grupie stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją RANKL w nabłonku a ekspresją OPG w nabłonku, ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w nabłonku, ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w torebce.

Wykazano również korelacje pomiędzy poziomami białek RANKL, OPG i MMP-9 (wewnątrzgrupowe) w torbielach korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach.

Poziom białka RANKL w nabłonku dodatnio korelował z poziomem RANKL w torebce w grupie torbieli korzeniowych, rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwiakach. Najsilniejszy związek ten był w szkliwiakach. Ponadto ekspresja MMP-9 w torebce dodatnio korelowała z ekspresją OPG w torebce w grupie torbieli korzeniowych, a siła związku była umiarkowana. Dla rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych wykazano dodatnie korelacje pomiędzy poziomem RANKL w nabłonku a poziomem OPG w nabłonku, pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a w torebce, pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a poziomem OPG w nabłonku, pomiędzy poziomem MMP-9 w nabłonku a poziomem RANKL w torebce. Ponadto wykazano dodatnią korelację pomiędzy ekspresją OPG w nabłonku i w torebce w rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych i szkliwia-

kach, współczynnik korelacji wynosił odpowiednio 0,5 i 0,8. W szkliwiaku ta korelacja była silniejsza. Może to sugerować, że ekspresja RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona. Ponadto poziom białek RANKL i OPG może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i OPG w osteolizie kości.

Może to sugerować, że ekspresja MMP-9 i RANKL jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych. Ponadto poziom białek MMP-9 i RANKL może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno RANKL jak i MMP-9 w osteolizie kości.

Może to sugerować, że ekspresja MMP-9 i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona. Ponadto poziom białek MMP-9 i OPG może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno OPG jak i MMP-9 w osteolizie kości.

Uzyskane wyniki sugerują, że MMP-9 jest zaangażowana w proces resorpcji kości wywołanej przez osteoklasty możliwe, iż przez ułatwianie migracji osteoklastów poprzez macierz zewnątrzkomórkową. Dlatego specyficzne inhibitory MMP-9 mogłyby służyć w leczeniu niektórych chorób kości szczęki i żuchwy.

## 6. WNIOSKI

1. RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i MMP-9 wpływają na przebieg procesu resorpcji kości w szczęce i żuchwie.
2. Zwiększona ekspresja RANKL, MMP-9 i IL-1 $\alpha$  oraz zaburzenie stosunku RANKL/OPG w szkliwiaku, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym, torbieli korzeniowej i zawiązkowej świadczy o wpływie tych białek na powstawanie ubytków kostnych.
3. W szkliwiakach szczęki i żuchwy czynniki RANKL i OPG mogą miejscowo regulować metabolizm kostny i progresję tych guzów.
4. Wyższy poziom RANKL i obniżony poziom OPG w szkliwiaku wskazuje na jego agresywny charakter.
5. Silna ekspresja RANKL i MMP-9 wpływa na progresję guzów zębopochodnych.
6. Wzrost ekspresji OPG w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym, torbieli korzeniowej i zawiązkowej świadczy o reakcji obronnej organizmu przed patologiczną degradacją kości.
7. Wzrost ekspresji RANKL w nowotworach zębopochodnych zwiększa osteolizę kości.
8. Nie wykazano znamiennych różnic w ekspresji RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków.
9. IL-1 $\alpha$  zwiększa poziom zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu reakcji zapalnej w kości, szczególnie w torbieli korzeniowej.
10. Ekspresja RANKL, OPG i MMP-9 jest związana z interakcjami pomiędzy komórkami nabłonka a podścieliska w nowotworach i torbielach zębopochodnych.
11. Czynniki RANKL, OPG i MMP-9 są ze sobą dodatnio sprzężone.
12. Wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć znaczenie w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych nowotworów i torbieli zębopochodnych szczęki i żuchwy.

## 7. PIŚMIENICTWO

1. Abu-El-Naaj I., Ardekian L., Liberman R., Peled M.: Central giant cell granuloma of the mandibular condyle: a rare presentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002, 60, 8, 939-941.
2. Ahmadi AJ., Pirinjian GE., Sires BS.: Optic neuropathy and macular chorioretinal folds caused by orbital cherubism. *Arch Ophthalmol.* 2003, 121, 4, 570-573.
3. Akkaya P., Onalan G., Haberal N., Bayraktar N., Mülayim B., Zeyneloglu HB.: Doxycycline causes regression of endometriotic implants: a rat model. *Hum Reprod.* 2009, 24, 8, 1900-1908.
4. Amado Cuesta S., Gargallo Albiol J., Berini Aytés L., Gay Escoda C.: Review of 61 cases of odontoma. Presentation of an erupted complex odontoma. *Med Oral.* 2003, 8, 5, 366-373.
5. American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature.: Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *J Bone Miner Res.* 2000, 15, 12, 2293-2296.
6. Andersen TL., del Carmen Ovejero M., Kirkegaard T., Lenhard T., Foged NT., Delaissé JM.: A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone.* 2004, 35, 5, 1107-1119.
7. Anderson DM., Maraskovsky E., Billingsley WL., Dougall WC., Tometsko ME., Roux ER., Teepe MC., DuBose RF., Cosman D., Galibert L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997, 390, 6656, 175-179.
8. Ando K., Mori K., Rédini F., Heymann D.: RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol.* 2008, 5, 3, 263-268.
9. Andrade FR., Sousa DP., Mendonca EF., Silva TA., Lara VS., Batista AC.: Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008, 106, 4, 548-555.
10. Anvari K., Seilanian Toussi M., Kalantari M., Naseri S., Karimi Shahri M., Ahmadnia H., Katebi M., Sedighi Pashaki A., Dayani M., Brou-

- mand M.: Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. *Urol J.* 2012, 9, 1, 381-388.
11. Arashiyama T., Kodama Y., Kobayashi T., Hoshina H., Takagi R., Hayashi T., Cheng J., Saku T.: Ghost cell odontogenic carcinoma arising in the background of a benign calcifying cystic odontogenic tumor of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012, 114, 3, 35-40.
  12. 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.
  13. Asaumi J., Konouchi H., Hisatomi M., Matsuzaki H., Shigehara H., Honda Y., Kishi K.: MR features of aneurysmal bone cyst of the mandible and characteristics distinguishing it from other lesions. *Eur J Radiol.* 2003, 45, 2, 108-112.
  14. Asaumi J., Matsuzaki H., Hisatomi M., Konouchi H., Shigehara H., Kishi K.: Application of dynamic MRI to differentiating odontogenic myxomas from ameloblastomas. *Eur J Radiol.* 2002, 43, 1, 37-41.
  15. Aubin JE., Bonnelye E.: Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* 2000, 11, 11, 905-913.
  16. Avelar RL., Antunes AA., Carvalho RW., Bezerra PG., Oliveira Neto PJ., Andrade ES.: Odontogenic cysts: a clinicopathological study of 507 cases. *J Oral Sci.* 2009, 51, 4, 581-586.
  17. Baker PJ.: The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2000, 2, 10, 1181-1192.
  18. Barnes L., Eveson JW., Reichart P., Sidransky D.: World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon, France, IARC Press, 2005. ISBN 92-832-2417-5
  19. Bartsch R., Steger GG., Gnat M., Ziebermayr R.: Breast cancer: Rankl ligand inhibition. *Breast Care (Basel).* 2010, 5, 5, 320-325.
  20. Bataineh AB.: Aneurysmal bone cysts of the maxilla: a clinicopathologic review. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997, 55, 11, 1212-1216.
  21. Becelli R., Carboni A., Cerulli G., Perugini M., Iannetti G.: Mandibular ameloblastoma: analysis of surgical treatment carried out in 60 patients between 1977 and 1998. *J Craniofac Surg.* 2002, 13, 3, 395-400.

22. Bekker PJ., Holloway D., Nakanishi A., Arrighi M., Leese PT., Dunstan CR.: The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001, 16, 2, 348-360.
23. Bekker PJ., Holloway DL., Rasmussen AS., Murphy R., Martin SW., Leese PT., Holmes GB., Dunstan CR., DePaoli AM.: A single-dose placebo-controlled study of AMG162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004, 19, 7, 1059-1066.
24. Bello IO., Qannam A., Al-Zahrani A., Al-Dosari A.: Peripheral dentinogenic ghost cell tumor: report of a case and literature review. *Int J Surg Pathol.* 2012, 20, 5, 494-499.
25. Birkedal-Hansen H., Moore WG., Bodden MK., Windsor LJ., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler JA.: Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993, 4, 2, 197-250.
26. Blair JM., Zhou H., Seibel MJ., Dunstan CR.: Mechanisms of disease: roles of OPG, RANKL and RANK in the pathophysiology of skeletal metastasis. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006, 3, 1, 41-49.
27. Bonfil RD., Sabbota A., Nabha S., Bernardo MM., Dong Z., Meng H., Yamamoto H., Chinni SR., Lim IT., Chang M., Filetti LC., Mobashery S., Cher ML., Fridman R.: Inhibition of human prostate cancer growth, osteolysis and angiogenesis in a bone metastasis model by a novel mechanism-based selective gelatinase inhibitor. *Int J Cancer.* 2006, 118, 11, 2721-2726.
28. Boyce BF., Li P., Yao Z., Zhang Q., Badell IR., Schwarz EM., O'Keefe RJ., Xing L.: TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med.* 2005, 54, 3, 127-131.
29. Boyce BF., Rosenberg E., de Papp AE., Duong le T.: The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2012, 42, 12, 1332-1341.
30. Boyce BF., Xing L.: Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9 Suppl 1, S1.
31. Boyce BF., Xing L.: Functions of RANKL / RANK / OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008, 473, 2, 139-146.
32. Boyce BF., Xing L.: The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007, 5, 3, 98-104.

33. 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.
34. Boyle WJ., Simonet WS., Lacey DL.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003, 423, 6937, 337-342.
35. Brandwein M., Said-Al-Naief N., Gordon R., Urken M.: Clear cell odontogenic carcinoma: report of a case and analysis of the literature. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002, 128, 9, 1089-1095.
36. Brannon RB., Fowler CB., Carpenter WM., Corio RL.: Cementoblastoma: an innocuous neoplasm? A clinicopathologic study of 44 cases and review of the literature with special emphasis on recurrence. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002, 93, 3, 311-320.
37. Brannon RB., Fowler CB.: Benign fibro-osseous lesions: a review of current concepts. *Adv Anat Pathol.* 2001, 8, 3, 126-143.
38. Bregni RC., Taylor AM., Garcia AM.: Ameloblastic fibrosarcoma of the mandible: report of two cases and review of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2001, 30, 5, 316-320.
39. Brounais B., Ruiz C., Rousseau J., Lamoureux F., Blanchard F., Heymann D., Redini F.: Novel anti-cancer strategy in bone tumors by targeting molecular and cellular modulators of bone resorption. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2008, 3, 3, 178-186.
40. Campbell D., Jeffrey RR., Wallis F., Hulks G., Kerr KM.: Metastatic pulmonary ameloblastoma. An unusual case. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003, 41, 3, 194-196.
41. Canete-Soler R., Litzky L., Lubensky I., Muschel RJ.: Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1994, 144, 3, 518-527.
42. Canger EM., Celenk P., Kayipmaz S., Alkant A., Gunhan O.: Familial ossifying fibromas: report of two cases. *J Oral Sci.* 2004, 46, 1, 61-64.
43. Carlos R., Sedano HO.: Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002, 93, 2, 161-166.
44. Carvalho VM., Perdigão PF., Amaral FR., de Souza PE., De Marco L., Gomez RS.: Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism. *Oral Dis.* 2009, 15, 1, 106-110.



45. Castellano D., Sepulveda JM., García-Escobar I., Rodríguez-Antolín A., Sundlöv A., Cortes-Funes H.: The role of RANK-ligand inhibition in cancer: the story of denosumab. *Oncologist*. 2011, 16, 2, 136-145.
46. 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.
47. Chiang YY., Tsai MH., Lin TY., Chiang IP.: Expression profile of metastasis-related genes in invasive oral cancers. *Histol Histopathol*. 2008, 23, 10, 1213-1222.
48. Chin JR., Werb Z.: Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development*. 1997, 124, 8, 1519-1530.
49. Chirgwin JM., Guise TA.: Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2000, 10, 2, 159-178.
50. Colombo F., Cursiefen C., Neukam FW., Holbach LM.: Orbital involvement in cherubism. *Ophthalmology*. 2001, 108, 10, 1884-1888.
51. Cross JJ., Pilkington RJ., Antoun NM., Adlam DM.: Value of computed tomography and magnetic resonance imaging in the treatment of a calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumour. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000, 38, 2, 154-157.
52. Da Silva TA., Batista AC., Mendonça EF., Leles CR., Fukada, S., Cunha FQ.: Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008, 105, 3, 333-341.
53. Dahlkemper P., Wolcott JF., Pringle GA., Hicks ML.: Periapical central giant cell granuloma: a potential endodontic misdiagnosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000, 90, 6, 739-745.
54. Dal Cin P., Sciot R., Fossion E., Van Damme B., Van den Berghe H.: Chromosome abnormalities in cementifying fibroma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1993, 71, 2, 170-172.
55. Datta R., Winston JS., Diaz-Reyes G., Loree TR., Myers L., Kuriakose MA., Rigual NR., Hicks WL. Jr.: Ameloblastic carcinoma: report of an aggressive case with multiple bony metastases. *Am J Otolaryngol*. 2003, 24, 1, 64-69.

56. de Andrade Santos PP., de Aquino AR., Oliveira Barreto A., de Almeida Freitas R., Galvão HC., de Souza LB.: Immunohistochemical expression of nuclear factor  $\kappa$ B, matrix metalloproteinase 9, and endoglin (CD105) in odontogenic keratocysts, dentigerous cysts, and radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011, 112, 4, 476-483.
57. de Lange J., van den Akker HP., Klip H.: Incidence and disease-free survival after surgical therapy of central giant cell granulomas of the jaw in The Netherlands: 1990-1995. *Head Neck.* 2004, 26, 9, 792-795.
58. de Moraes M., de Lucena HF., de Azevedo PR., Queiroz LM., Costa Ade L.: Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts. *Arch Oral Biol.* 2011, 56, 11, 1256-1263.
59. de Moraes M., de Matos FR., de Souza LB., de Almeida Freitas R., de Lisboa Lopes Costa A.: Immunoeexpression of RANK, RANKL, OPG, VEGF, and vWF in radicular and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2013, 42, 6, 468-473.
60. de Oliveira MD., de Miranda JL., de Amorim RF., de Souza LB., de Almeida Freitas R.: Tenascin and fibronectin expression in odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med.* 2004, 33, 6, 354-359.
61. de Vicente JC., Fresno MF., Villalain L., Vega JA., Hernandez Vallejo G.: Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005, 41, 3, 283-293.
62. Delaissé JM., Andersen TL., Engsig MT., Henriksen K., Troen T., Blavier L.: Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech.* 2003, 61, 6, 504-513.
63. Delaissé JM., Engsig MT., Everts V., del Carmen Ovejero M., Ferreras M., Lund L., Vu TH., Werb Z., Winding B., Lochter A., Karsdal MA., Troen T., Kirkegaard T., Lenhard T., Heegaard AM., Neff L., Baron R., Foged NT.: Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta.* 2000, 291, 2, 223-234.
64. Dhir K., Sciubba JJ., Tufano RP.: Ameloblastic carcinoma of the maxilla. *Oral Oncol.* 2003, 39, 7, 736-741.
65. Dore RK.: The RANKL pathway and denosumab. *Rheum Dis Clin North Am.* 2011, 37, 3, 433-452.

66. Duffy MJ., Maguire TM., Hill A., McDermott E., O'Higgins N.: Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2000, 2, 4, 252-257.
67. Dunn MD., Park CH., Kostenuik PJ., Kapila S., Giannobile WV.: Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone*, 2007, 41, 3, 446-455.
68. Duvina M.: Biochemical markers as predictors of bone remodelling in dental disorders : a narrative description of literature. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2012, 9, 2, 100-106.
69. Eriksson L., Hansson LG., Akesson L., Stahlberg F.: Simple bone cyst: a discrepancy between magnetic resonance imaging and surgical observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001, 92, 6, 694-698.
70. Finkelstein MW., Hellstein JW., Lake KS., Vincent SD.: Keratocystic odontogenic tumor: A retrospective analysis of genetic, immunohistochemical and therapeutic features. Proposal of a multicenter clinical survey tool. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013, 116, 1, 75-83.
71. Fizazi K., Lipton A., Mariette X., Body JJ., Rahim Y., Gralow JR., Gao G., Wu L., Sohn W., Jun S.: Randomized phase II trial of denosumab in patients with bone metastases from prostate cancer, breast cancer, or other neoplasms after intravenous bisphosphonates. *J Clin Oncol.* 2009, 27, 10, 1564-1571.
72. Fregnani ER., Fillipi RZ., Oliveira CR., Vargas PA, Almeida OP.: Odontomas and ameloblastomas: variable prevalences around the world? *Oral Oncol.* 2002, 38, 8, 807-808.
73. Fregnani ER., Sobral LM., Alves FA., Soares FA., Kowalski LP., Colletta RD.: Presence of myofibroblasts and expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in ameloblastomas correlate with rupture of the osseous cortical. *Pathol Oncol Res.* 2009, 15, 2, 231-240.
74. Fukada SY., Silva TA., Garlet GP., Rosa AL., 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.
75. Fuller K., Kirstein B., Chambers TJ.: Regulation and enzymatic basis of bone resorption by human osteoclasts. *Clin Sci (Lond).* 2007, 112, 11, 567-575.

76. Garlet GP., Cardoso CR., Campanelli AP., Martins W. Jr, Silva JS.: Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res.* 2006, 41, 6, 580-584.
77. Garlet GP., Cardoso CR., Silva TA., Ferreira BR., Avila-Campos MJ., Cunha FQ., Silva JS.: Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006, 21, 1, 12-20.
78. Garlet TP., Coelho U., Silva JS., Garlet GP.: Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007, 115, 5, 355-362.
79. George JC., Edwards MK., Jakacki RI., Kho-Duffin J.: Melanotic neuroectodermal tumor of infancy. *ANJR Am J Neuroradiol.* 1995, 16, 6, 1273-1275.
80. Gollin SM., Storto PD., Malone PS., Barnes L., Washington JA., Chidambaram A., Janecka IP.: Cytogenetic abnormalities in an ossifying fibroma from a patient with bilateral retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992, 4, 2, 146-152.
81. Gong Y., Wang L., Wang H., Li T., Chen X.: The expression of NF-kappaB, Ki-67 and MMP-9 in CCOT, DGCT and GCOC. *Oral Oncol.* 2009, 45, 6, 515-520.
82. Gonzalez-Suarez E., Branstetter D., Armstrong A., Dinh H., Blumberg H., Dougall WC.: RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol.* 2007, 27, 4, 1442-1454.
83. Grimaud E., Soubigou L., Couillaud S., Coipeau P., Moreau A., Pasuti N., Gouin F., Redini F., Heymann D.: Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol.* 2003, 163, 5, 2021-2031.
84. Hall JM., Weathers DR., Unni KK.: Ameloblastic carcinoma: an analysis of 14 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007, 103, 6, 799-807.
85. Hamdy NA. Osteoprotegerin as a potential therapy for osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2005, 3, 4, 121-125.

86. Hannon TS., Noonan K., Steinmetz R., Eugster EA., Levine MA., Pescovitz OH.: Is McCune-Albright syndrome overlooked in subjects with fibrous dysplasia of bone? *J Pediatr.* 2003, 142, 5, 532-538.
87. Haque S., McCarville MB., Sebire N., McHugh K.: Melanotic neuroectodermal tumour of infancy: CT and MR findings. *Pediatr Radiol.* 2012, 42, 6, 699-705.
88. Heidinger M., Kolb H., Krell HW., Jochum M., Ries C.: Modulation of autocrine TNF-alpha-stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells. *Biol Chem.* 2006, 387, 1, 69-78.
89. Heikinheimo K., Jee KJ., Niini T., Aalto Y., Happonen RP., Leivo I., Knuutila S.: Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res.* 2002, 81, 8, 525-530.
90. Henderson JM., Sonnet JR., Schlesinger C., Ord RA.: Pulmonary metastasis of ameloblastoma: case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997, 88, 2, 170-176.
91. Henriques ÁCG., Vasconcelos MG., Galvão HC., de Souza LB., de Almeida Freitas R.: Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011, 112, 4, 468-475.
92. Heymann D.: Anti-RANKL therapy for bone tumours: Basic, pre-clinical and clinical evidences. *J Bone Oncol.* 2012, 1, 1, 2-11.
93. Hisatomi M., Asaumi JI., Konouchi H., Honda Y., Wakasa T., Kishi K.: A case of complex odontoma associated with an impacted lower deciduous second molar and analysis of the 107 odontomas. *Oral Dis.* 2002, 8, 2, 100-105.
94. Hofbauer LC., Schoppet M.: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA.* 2004, 292, 4, 490-495.
95. Hofbauer LC.: Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). *Ann Endocrinol (Paris).*, 2006, 67, 2, 139-141.
96. Horowitz MC., Xi Y., Wilson K., Kacena MA.: Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001, 12, 1, 9-18.
97. Hsu H., Lacey DL., Dunstan CR., Solovyev I., Colombero A., Timms E., Tan HL., Elliott G., Kelley MJ., Sarosi I., Wang L., Xia XZ., Elliott

- R., Chiu L., Black T., Scully S., Capparelli C., Morony S., Shimamoto G., Bass MB., Boyle WJ.: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, 96, 7, 3540-3545.
98. Huang L., Cheng YY., Chow LT., Zheng MH., Kumta SM.: Tumour cells produce receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in skeletal metastases. *J Clin Pathol*. 2002, 55, 11, 877-878.
99. Huguet P., Castellví J., Avila M., Alejo M., Autonell F., Basas C., Bescos MS.: Ameloblastic fibrosarcoma: report of a case. Immunohistochemical study and review of the literature. *Med Oral*. 2001, 6, 3, 173-179.
100. Ikebe T., Shinohara M., Takeuchi H., Beppu M., Kurahara S., Nakamura S., Shirasuna K.: Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis*. 1999, 17, 4, 315-323.
101. Ikeda T., Kasai M., Suzuki J., Kuroyama H., Seki S., Utsuyama M., Hirokawa K.: Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2003, 278, 47, 47217-47222.
102. Ishibashi O., Niwa S., Kadoyama K., Inui T.: MMP-9 antisense oligodeoxynucleotide exerts an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption by suppressing cell migration. *Life Sci*. 2006, 79, 17, 1657-1660.
103. Itoh T., Matsuda H., Tanioka M., Kuwabara K., Itohara S., Suzuki R.: The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol*. 2002, 169, 5, 2643-2647.
104. Jin Q., Cirelli JA., Park CH., Sugai JV., Taba M. Jr, Kostenuik PJ., Giannobile WV.: RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2007, 78, 7, 1300-1308.
105. Kaban LB., Troulis MJ., Ebb D., August M., Hornicek FJ., Dodson TB.: Antiangiogenic therapy with interferon alpha for giant cell lesions of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002, 60, 10, 1103-1111.
106. Kaczmarzyk T., Stypułkowska J., Tomaszewska R., Czopek J.: Nowotwory zębopochodne i guzy nowotworopodobne kości szczękowych. Wydawnictwo Kwintesencja. Warszawa, 2009. ISBN 978-83-85700-59-3.

107. Kanno S., Hirano S., Kayama F.: Effects of the phytoestrogen coumestrol on RANK-ligand-induced differentiation of osteoclasts. *Toxicology*. 2004, 203, 1-3, 211-220.
108. Kanzaki H., Chiba M., Shimizu Y., Mitani H.: Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res*. 2001, 80, 3, 887-891.
109. Kaplan I., Buchner A., Calderon S., Kaffe I.: Radiological and clinical features of calcifying epithelial odontogenic tumour. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001, 30, 1, 22-28.
110. Kaplan RN., Riba RD., Zacharoulis S., Bramley AH., Vincent L., Costa C., MacDonald DD., Jin DK., Shido K., Kerns SA., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port JL., Altorki N., Port ER., Ruggero D., Shmelkov SV., Jensen KK., Rafii S., Lyden D.: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the premetastatic niche. *Nature*, 2005, 438, 7069, 820-827.
111. Kearns AE., Khosla S., Kostenuik PJ.: Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008, 29, 2, 155-192.
112. Khosla S.: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001, 142, 12, 5050-5055.
113. Kibe T., Fuchigami T., Kishida M., Iijima M., Ishihata K., Hijioka H., Miyawaki A., Semba I., Nakamura N., Kiyono T., Kishida S.: A novel ameloblastoma cell line (AM-3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013, 115, 6, 780-788.
114. Kichi E., Enokiya Y., Muramatsu T., Hashimoto S., Inoue T., Abiko Y., Shimono M.: Cell proliferation, apoptosis and apoptosis-related factors in odontogenic keratocysts and in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*. 2005, 34, 5, 280-286.
115. Kim J., Lee EH., Yook JI., Han JY., Yoon JH., Ellis GL.: Odontogenic ghost cell carcinoma: a case report with reference to the relation between apoptosis and ghost cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000, 90, 5, 630-635.
116. Kmieć Z., Sokołowska I.: Rola cytokin z rodziny czynnika martwicy nowotworu w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów – nowe możliwości terapii. *Pol Merkuriusz Lek*. 2007, 22, 130, 300-304.



117. Kopper L.: Denosumab - a powerful RANKL inhibitor to stop lytic metastases and other bone loss actions by osteoclasts. *Pathol Oncol Res.* 2012, 18, 4, 743-747
118. Krajewska M., Fenoglio-Preiser CM., Krajewski S.: Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins In adenocarcinomas of stomach. *Am J Pathol.* 1996, 149, 5, 1449-1457.
119. Kramer IRH., Pindborg JJ., Shear M.: *Histological typing of odontogenic tumours*, 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg NewYork, 1992, ISBN 978-3-540-54142-4.
120. Kubota T., Nomura T., Takahashi T., Hara K.: Expression of mRNA for matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontitis-affected human gingival tissue. *Arch Oral Biol.* 1996, 41, 3, 253-262.
121. Kubota Y., Ninomiya T., Oka S., Takenoshita Y., Shirasuna K.: Interleukin-1-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.
122. Kubota Y., Nitta S., Oka S., Nakagawa S., Ninomiya T., Shirasuna K.: Discrimination of ameloblastomas from odontogenic keratocysts by cytokine levels and gelatinase species of the intracystic fluids. *J Oral Pathol Med.* 2001, 30, 7, 421-427.
123. Kumamoto H., Ooya K.: Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004, 33, 1, 46-52.
124. Kumamoto H., Yamauchi K., Yoshida M., Ooya K.: Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2003, 32, 2, 114-120.
125. Kumamoto H., Yoshida M., Ooya K.: Immunohistochemical detection of amelogenin and cytokeratin 19 in epithelial odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2001, 7, 3, 171-176.
126. Kurtz M., Mesa M., Alberto P.: Treatment of a central giant cell lesion of the mandible with intralesional glucocorticosteroids. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001, 91, 6, 636-637.
127. Lacey DL., Boyle WJ., Simonet WS., Kosteniuk PJ., Dougall WC., Sullivan JK., San Martin J., Dansey R.: Bench to bedside: elucidation



- of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2012, 11, 5, 401-419.
128. Lacey DL., Tan HL., Lu J., Kaufman S., Van G., Qiu W., Rattan A., Scully S., Fletcher F., Juan T., Kelley M., Burgess TL., Boyle WJ., Polverino AJ.: Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* 2000, 157, 2, 435-448.
  129. Lacey DL., Timms E., Tan HL., Kelley MJ., Dunstan CR., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian YX., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle WJ.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998, 93, 2, 165-176.
  130. Lee SH., Kim TS., Choi Y., Lorenzo J.: Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *Biochem Mol Biol Rep.* 2008, 41, 7, 495-510.
  131. Lee SK, Gardner AE, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Lorenzo JA.: RANKL-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production. *Bone.* 2006, 38, 5, 678-685.
  132. Leibbrandt A., Penninger JM.: RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci.* 2008, 1143, 123-150.
  133. Leithner A., Windhager R., Lang S., Haas OA., Kainberger F., Kotz R.: Aneurysmal bone cyst. A population based epidemiologic study and literature review. *Clin Orthop Relat Res.* 1999, 363, 176-179.
  134. Li TJ., Yu SF.: Clinicopathologic spectrum of the so-called calcifying odontogenic cysts: a study of 21 intraosseous cases with reconsideration of the terminology and classification. *Am J Surg Pathol.* 2003, 27, 3, 372-384.
  135. Lin LM., Huang GT., Rosenberg PA.: Proliferation of epithelial cell rests formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod.* 2007, 33, 8, 908-916.
  136. Liotta LA., Stetler-Stevenson WG.: Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol.* 1990, 1, 2, 99-106.
  137. Lipton A., Goessl C.: Clinical development of anti-RANKL therapies for treatment and prevention of bone metastasis. *Bone.* 2011, 48, 1, 96-99.

138. Liu B., Yu SF., Li TJ.: Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med.* 2003, 32, 6, 367-375.
139. Liu XH., Kirschenbaum A., Yao S., Levine AC.: Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology.* 2005, 146, 4, 1991-1998.
140. Lu Y., Mock D., Takata T., Jordan RC.: Odontogenic ghost cell carcinoma: report of four new cases and review of the literature. *J Oral Pathol Med.* 1999, 28, 7, 323-329.
141. Lustig LR., Holliday MJ., McCarthy EF., Nager GT.: Fibrous dysplasia involving the skull base and temporal bone. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001, 127, 10, 1239-1247.
142. Määttä M., Soini Y., Liakka A., Autio-Harmanen H.: Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 7, 2726-2734.
143. Mäkelä M., Salo T., Uitto VJ., Larjava H.: Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994, 73, 8, 1397-1406.
144. Makowski GJ., McGuff S., Van Sickels JE.: Squamous cell carcinoma in a maxillary odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001, 59, 1, 76-80.
145. Manenti L., Paganoni P., Floriani I., Landoni F., Torri V., Buda A., Taraboletti G., Labianca R., Belotti D., Giavazzi R.: Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur J Cancer.* 2003, 39, 13, 1948-1956.
146. Martin-Granizo Lopez R., Ortega L., Gonzalez Corchon MA., Berguer Sández: Ameloblastic fibroma of the mandible. Report of two cases. *Med Oral.* 2003, 8, 2, 150-153.
147. McClung MR., Lewiecki EM., Cohen SB., Bolognese MA., Woodson GC., Moffett AH., Peacock M., Miller PD., Lederman SN., Chesnut CH., Lain D., Kivitz AJ., Holloway DL., Zhang C., Peterson MC., Bekker PJ., AMG 162 Bone Loss Study Group: Denosumab in post-

- menopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2006, 354, 8, 821-831.
148. Mendenhall WM., Werning JW., Fernandes R., Malyapa RS., Mendenhall NP.: Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol.* 2007, 30, 6, 645-648.
  149. Mendes RA., Carvalho JF., van der Waal I.: Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features. *Oral Oncol.* 2010, 46, 4, 219-225.
  150. Menezes R., Bramante CM., da Silva Paiva KB., Letra A., Carneiro E., Fernando Zambuzzi W., Granjeiro JM.: Receptor activator NF $\kappa$ B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006, 102, 3, 404-409.
  151. Menezes R., Garlet TP., Letra A., Bramante CM., Campanelli AP., Figueira Rde C., Sogayar MC., Granjeiro JM., Garlet GP.: Differential patterns of RANKL/OPG expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod.* 2008, 34, 8, 932-938.
  152. Miller PD.: Denosumab: anti-RANKL antibody. *Curr Osteoporos Rep.* 2009, 7, 1, 18-22.
  153. Minamiguchi S., Mikami Y., Nakajima N., Salah A., Kondoh E., Tatsumi K., Konishi I., Haga H.: Complement split product C4d deposition in placenta in systemic lupus erythematosus and pregnancy-induced hypertension. *Pathol Int.* 2013, 63, 3, 150-157.
  154. Minn AJ., Gupta GP., Siegel PM., Bos PD., Shu W., Giri DD., Viale A., Olshen AB., Gerald WL., Massagué J.: Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005, 436, 7050, 518-524.
  155. Miyamoto T., Ohneda O., Arai F., Iwamoto K., Okada S., Takagi K., Anderson DM., Suda T.: Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood.* 2001, 98, 8, 2544-2554.
  156. Mizuno, Amizuka N., Irie K., Murakami, Fujise N., Kanno T., Sato Y., Nakagawa N., Yasuda H., Mochizuki S., Gomibuchi T., Yano K., Shima N., Washida N., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Ozawa H.: Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988, 247, 3, 610-615.

157. Mogi M., Ootogoto J., Ota N., Togari A.: Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004, 83, 2, 166-169.
158. Monteagudo C., Merino MJ., San-Juan J., Liotta LA., Stetler-Stevenson WG.: Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am J Pathol.* 1990, 136, 3, 585-592.
159. Morrissey C., Kostenuik PL., Brown LG., Vessella RL., Corey E.: Host-derived RANKL is responsible for osteolysis in a C4-2 human prostate cancer xenograft model of experimental bone metastases. *BMC Cancer.* 2007, 3, 7, 148.
160. Mosqueda-Taylor A., Carlos-Bregni R., Ramirez-Amador V., Palma-Guzman JM., Esquivel-Bonilla D., Hernandez-Rojase LA.: Odontameloblastoma. Clinicopathologic study of three cases and critical review of the literature. *Oral Oncol.* 2002, 38, 8, 800-805.
161. Motamedi MH.: Destructive aneurysmal bone cyst of the mandibular condyle: report of a case and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002, 60, 11, 1357-1361.
162. 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.
163. Mundy GR.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 8, 584-593.
164. Nagase H., Visse R., Murphy G.: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006, 69, 3, 562-573.
165. Nagase H.: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997, 378, 151-160.
166. Nagatsuka H., Siar CH., Nakano K., Tsujigiwa H., Gunduz M., Choufuku H., Lee YJ., Naito I., Sado Y., Nagai N.: Differential expression of collagen IV alpha1 to alpha6 chains in basement membranes of benign and malignant odontogenic tumors. *Virchows Arch.* 2002, 441, 4, 392-399.
167. Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Yano K., Morinaga T., Higashio K.: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 253, 2, 395-400.
168. Nicolin V., Bortol R., Bareggi R., Baldini G., Martinelli B., Narducci P.: Breast adenocarcinoma MCF-7 cell line induces spontaneous oste-

- oclastogenesis via a RANK-ligand-dependent pathway. *Acta Histochem.* 2008, 110, 5, 388-396.
169. Nogueira RL., Faria MH., Osterne RL., Cavalcante RB., Ribeiro RA., Rabenhorst SH.: Glucocorticoid and calcitonin receptor expression in central giant cell lesions: implications for therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012, 8, 994-1000.
  170. Nonaka CF., Cavalcante RB., Nogueira RL., de Souza LB., Pinto LP.: Immunohistochemical analysis of bone resorption regulators (RANKL and OPG), angiogenic index, and myofibroblasts in syndrome and non-syndrome odontogenic keratocysts. *Arch Oral Biol.* 2012, 57, 3, 230-237.
  171. O'Regan EM., Gibb DH., Odell EW.: Rapid growth of giant cell granuloma in pregnancy treated with calcitonin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001, 92, 5, 532-538.
  172. Oka S., Kubota Y., Yamashiro T., Ogata S., Ninomiya T., Ito S., Shirasuna K.: Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res.* 2005, 84, 10, 913-918.
  173. Okada Y., Gonoji Y., Nakanishi I., Nagase H., Hayakawa T.: Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1990, 59, 5, 305-312.
  174. Ota Y., Aoki T., Otsuru M., Hirabayashi K., Nakamura N., Tsukinoki K.: Huge ameloblastoma associated with hypercalcemia, leukocytosis, and elevated tumor markers via production of parathyroid hormone-related protein and granulocyte colony-stimulating factor. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012, 70, 6, 1380-1385.
  175. Page G., Miossec P.: RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 8, 2307-2312.
  176. Pahl S., Henn W., Binger T., Stein U., Remberger K.: Malignant odontogenic myxoma of the maxilla: case with cytogenetic confirmation. *J Laryngol Otol.* 2000, 114, 7, 533-535.
  177. Pan S., Xu LL., Sun LS., Li TJ.: Identification of known and novel PTCH mutations in both syndromic and non syndromic keratocystic odontogenic tumors. *Int J Oral Sci.* 2009, 1, 1, 34-38.
  178. Parham DM., Bridge JA., Lukacs JL., Ding Y., Tryka AF., Sawyer JR.: Cytogenetic distinction among benign fibro-osseous lesions of

- bone in children and adolescents: value of karyotypic findings in differential diagnosis. *Pediatr Dev Pathol.* 2004, 7, 2, 148-158.
179. Philipsen HP., Reichart PA., Nikai H., Takata T., Kudo Y.: Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. *Oral Oncol.* 2001, 37, 1, 17-27.
180. Philipsen HP., Reichart PA., Praetorius F.: Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol.* 1997, 33, 2, 86-99.
181. Philipsen HP., Reichart PA., Takata T.: Desmoplastic ameloblastoma (including "hybrid" lesion of ameloblastoma). Biological profile based on 100 cases from the literature and own files. *Oral Oncol.* 2001, 37, 5, 455-460.
182. Philipsen HP., Reichart PA.: Calcifying epithelial odontogenic tumour: biological profile based on 181 cases from the literature. *Oral Oncol.* 2000, 36, 1, 17-26.
183. Philipsen HP., Reichart PA.: Revision of the 1992 edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. *J Oral Pathol Med.* 2002, 31, 253-258.
184. Philipsen HP., Reichart PA.: Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncol.* 1998, 34, 5, 317-325.
185. Pierceall WE., Wolfe M., Suschak J., Chang H., Chen Y., Sprott KM., Kutok JL., Quan S., Weaver DT., Ward BE.: Strategies for H-score normalization of preanalytical technical variables with potential utility to immunohistochemical-based biomarker quantitation in therapeutic response diagnostics. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011, 34, 3, 159-168.
186. Pinheiro JJ., Freitas VM., Moretti AI., Jorge AG., Jaeger RG.: Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology.* 2004, 45, 1, 65-72.
187. Ponti G., Tomasi A., Pastorino L., Ruini C., Guarneri C., Mandel VD., Seidenari S., Pellacani G.: Diagnostic and pathogenetic role of café-au-lait macules in nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hered Cancer Clin Pract.* 2012, 10, 1, 15.
188. Poomsawat S., Punyasingh J., Weerapradist W.: Expression of basement membrane components in odontogenic cysts. *Oral Dis.* 2006, 12, 3, 290-296.

189. Qian Y., Huang H-Z.: The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2010, 39, 8, 592-598.
190. Radu OM., Foxwell T., Cieply K., Navina S., Dacic S., Nason KS., Davison JM.: HER2 amplification in gastroesophageal adenocarcinoma: correlation of two antibodies using gastric cancer scoring criteria, H score, and digital image analysis with fluorescence in situ hybridization. *Am J Clin Pathol.* 2012, 137, 4, 583-594.
191. Ramer M., Buonocore P., Krost B.: Central odontogenic fibroma - report of a case and review of the literature. *Periodontal Clin Investig.* 2002, 24, 1, 27-30.
192. Rani CS., MacDougall M.: Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000, 3, 3, 145-152.
193. Redlich K., Hayer S., Maier A., Dunstan CR., Tohidast-Akrad M., Lang S., Türk B., Pietschmann P., Woloszczuk W., Haralambous S., Kollias G., Steiner G., Smolen JS., Schett G. Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 3, 785-792.
194. Regezi JA.: Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibroosseous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol.* 2002, 15, 3, 331-341.
195. Reichart PA., Philipsen HP., Sonner S.: Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995, 31B, 2, 86-99.
196. Ribeiro AL., Nobre RM., Alves-Junior SM., Kataoka MS., Barroso RF., Jaeger RG., Pinheiro JJ.: Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and growth factors regulate the aggressiveness and proliferative activity of keratocystic odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012, 114, 4, 487-496.
197. Ribeiro BF., Iglesias DP., Nascimento GJ., Galvão HC., Medeiros AM., Freitas RA.: Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.* 2009, 15, 7, 472-477.
198. Ring P, Johansson K, Höyhty M, Rubin K, Lindmark G.: Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-2 in human colorectal cancer - a predictor of tumour stage. *Br J Cancer.* 1997, 76, 6, 805-811.
199. Rogers A., Eastell R.: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90, 11, 6323-6331.



- 
200. Romas E.: Clinical applications of RANK-ligand inhibition. *Intern Med J.* 2009, 39, 2, 110-116.
  201. Rosenstein T., Pogrel MA., Smith RA., Regezi JA.: Cystic ameloblastoma-behavior and treatment of 21 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001, 59, 11, 1311-1316.
  202. Rosenthal EL., Matrisian LM.: Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck.* 2006, 28, 7, 639-648.
  203. Rothschild SI., Kappeler A., Ratschiller D., Betticher DC., Tschan MP., Gugger M., Gautschi O.: The stem cell gene "inhibitor of differentiation 1" (ID1) is frequently expressed in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2011, 71, 3, 306-311.
  204. Ruiz PA., Toledo OA., Nonaka CF., Pinto LP., Souza LB.: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in radicular and residual radicular cysts. *J Appl Oral Sci.* 2010, 18, 6, 613-620.
  205. Said-al-Naief NA., Surwillo E.: Florid osseous dysplasia of the mandible: report of a case. *Compend Contin Educ Dent.* 1999, 20, 11, 1017-1019, 1022-1028 passim; quiz 1032.
  206. Sakata M., Shiba H., Komatsuzawa H., Fujita T., Ohta K., Sugai M., Suginaka H., Kurihara H.: Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res.* 1999, 14, 9, 1486-1492.
  207. Salmassy DA., Pogrel MA.: Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995, 53, 7, 784-790.
  208. Sampson DE., Pogrel MA.: Management of mandibular ameloblastoma: the clinical basis for a treatment algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 1999, 57, 9, 1074-1077.
  209. Sandra F., Hendarmin L., Kukita T., Nakao Y., Nakamura N., Nakamura S.: Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncol.* 2005, 41, 6, 637-644.
  210. Sandra F., Hendarmin L., Nakamura S.: Osteoprotegerin (OPG) binds with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): suppression of TRAIL-induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncol.* 2006, 42, 4, 415-420.

211. Sathi GS., Nagatsuka H., Tamamura R., Fujii M., Gunduz M., Inoue M., Rivera RS., Nagai N.: Stromal cells promote bone invasion by suppressing bone formation in ameloblastoma. *Histopathology*. 2008, 53, 4, 458-467.
212. Schett G., Hayer S., Zwerina J., Redlich K., Smolen JS.: Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005, 1, 1, 47-54.
213. Schett G., Redlich K., Hayer S., Zwerina J., Bolon B., Dunstan C., Görtz B., Schulz A., Bergmeister H., Kollias G., Steiner G., Smolen JS.: Osteoprotegerin protects against generalized bone loss in tumor necrosis factor-transgenic mice. *Arthritis Rheum*. 2003, 48, 7, 2042-2051.
214. Schneeweis LA., Willard D., Milla ME.: Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2005, 280, 50, 41155-41164.
215. Sengüven B., Oygür T.: Investigation of interleukin-1 alpha and interleukin-6 expression and interleukin-1 alpha gene polymorphism in keratocystic odontogenic tumors and ameloblastomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011, 16, 4, e467-472.
216. Shear M.: Cysts of the oral regions. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992; 136-162. ISBN 978-14051-4937-2.
217. Shear M.: Developmental odontogenic cysts. An update. *J Oral Pathol Med*. 1994, 23, 1, 1-11.
218. Shear M.: The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol*. 2002, 38, 4, 323-331.
219. Shen LC., Chen YK., Hsue SS., Shaw SY.: Expression of osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine and matrix metalloproteinases in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2010, 39, 3, 242-249.
220. Shimoyama T., Horie N., Nasu D., Kaneko T., Kato T., Tojo T., Suzuki T., Ide F.: So-called simple bone cyst of the jaw: a family of pseudocysts of diverse nature and etiology. *J Oral Sci*. 1999, 41, 2, 93-98.
221. Shipman CM., Croucher PI.: Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res*. 2003, 63, 5, 912-916.
222. Shoback D.: Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007, 92, 3, 747-753.

- 
223. Silveira EJD., Piva MR., Galvao HC., Souza LB., Freitas RA.: Role of matrix metalloproteinases in the etiopathogeny of odontogenic cysts. *J Bras Patol Med Lab*, 2007, 43, 3, 203-209.
224. Simon EN., Merckx MA., Vuhahula E., Ngassapa D., Stoeltinga PJ.: Odontogenic myxoma: a clinicopathological study of 33 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004, 33, 4, 333-337.
225. Simonet WS., Lacey DL., Dunstan CR., Kelley M., Chang MS., Lüthy R., Nguyen HQ., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan HL., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes TM., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle WJ.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997, 18, 89, 2, 309-319.
226. Siqueira AS., Carvalho MR., Monteiro AC., Freitas VM., Jaeger RG., Pinheiro JJ.: Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology*. 2010, 57, 1, 128-137.
227. Snead ML., Luo W., Hsu DD., Melrose RJ., Lau WE., Stenman G.: Human ameloblastoma tumors express the amelogenin gene. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992, 74, 1, 64-72.
228. So T., Lee SW., Croft M.: Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity. *Int J Hematol*. 2006, 83, 1, 1-11.
229. Somerville RP., Oblander SA., Apte SS.: Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol*. 2003, 4, 6, 216.
230. Stanisławowski M., Kmieć Z.: Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Postepy Hig Med Dosw*. 2009, 15, 63, 234-241.
231. Stashenko P., Teles R., D'Souza R.: Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998, 9, 4, 498-521.
232. Stavropoulos F., Katz J.: Central giant cell granulomas: a systematic review of the radiographic characteristics with the addition of 20 new cases. *Dentomaxillofac Radiol*. 2002, 31, 4, 213-217.
233. Sternlicht MD, Werb Z.: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001, 17, 463-516.
234. Suda T.: 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.

235. Takata T., Miyauchi M., Ogawa I., Kudo Y., Takekoshi T., Zhao M., Sato S., Nikai H., Komiyama K.: Immunoexpression of transforming growth factor beta in desmoplastic ameloblastoma. *Virchows Arch.* 2000, 436, 4, 319-323.
236. Tanaka H., Mine T., Ogasa H., Taguchi T., Liang CT.: Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, 411, 4, 690-694.
237. Tanaka S., Nakamura K., Takahasi N., Suda T.: Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev.* 2005, 208, 30-49.
238. Tat SK., Pelletier JP., Velasco CR., Padrines M., Martel-Pelletier J.: New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med.* 2009, 58, 1, 29-40.
239. Taubman MA., Valverde P., Han X., Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol.* 2005, 76, (11 Suppl), 2033-2041.
240. Tay JY., Bay BH., Yeo JF., Harris M., Meghji S., Dheen ST.: Identification of RANKL in osteolytic lesions of the facial skeleton. *J Dent Res.* 2004, 83, 4, 349-353.
241. Teitelbaum SL.: Osteoclasts: What do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007, 170, 2, 427-435.
242. Tekkesin MS., Mutlu S., Olgac V.: The role of RANK/RANKL/OPG signalling pathways in osteoclastogenesis in odontogenic keratocysts, radicular cysts, and ameloblastomas. *Head Neck Pathol.* 2011, 5, 3, 248-253.
243. Theoleyre S., Wittrant Y., Tat SK., Fortun Y., Redini, F., Heymann D.: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004, 15, 6, 457-475.
244. Thomas DM.: RANKL, denosumab, and giant cell tumor of bone. *Curr Opin Oncol.* 2012, 24, 4, 397-403.
245. Trøen BR.: The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect.* 2004, 17, 1, 19-28.
246. Tsuda E., Goto M., Mochizuki S., Yano K., Kobayashi F., Morinaga T., Higashio K.: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 234, 1, 137-142.

247. Vega D., Maalouf NM., Sakhaee K.: Clinical review the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand /osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92, 12, 4514-4521.
248. Veness MJ., Morgan G., Collins AP., Walker DM.: Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor with malignant transformation and metastatic spread. *Head Neck.* 2001, 23, 8, 692-696.
249. Verma RP., Hansch C.: Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem.* 2007, 15, 6, 2223-2268.
250. Vernal R., Dezerega A., Dutzan N., Chaparro A., León R., Chandía S., Silva A., Gamonal J.: RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis.* 2006, 12, 3, 283-289.
251. Virk MS., Lieberman JR.: Tumor metastasis to bone. *Arthritis Res Ther.* 2007, 9, Suppl 1: S5.
252. Weilbaecher KN., Guise T., Mc Cauley LK.: Cancer to Bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer.* 2011, 11, 6, 411-425.
253. Werner JA., Rathcke IO., Mandic R.: The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis.* 2002, 19, 4, 275-282.
254. Wettan HL., Patella PA., Freedman PD.: Peripheral ameloblastoma: review of the literature and report of recurrence as severe dysplasia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001, 59, 7, 811-815.
255. Woessner JF Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991, 5, 8, 2145-2154.
256. 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.
257. Wong BR., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett FS. 3rd, Frankel WN., Lee SY., Choi Y.: TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem.* 1997, 272, 40, 25190-25194.
258. Xing L., Boyce BF.: Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 328, 3, 709-720.

- 
259. Yang SF., Yang WE., Kuo WH., Chang HR., Chu SC., Hsieh YS.: Antimetastatic potentials of flavones on oral cancer cell via an inhibition of matrix-degrading proteases. *Arch Oral Biol.* 2008, 53, 3, 287-294.
  260. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T.: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95, 31, 3597-3602.
  261. Yavropoulou MP., Yovos JG.: Osteoclastogenesis-current knowledge and future perspectives., *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008, 8, 3, 204-216.
  262. Yoon HJ., Jo BC., Shin WJ., Cho YA., Lee JI., Hong SP., Hong SD.: Comparative immunohistochemical study of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011, 112, 6, 767-776.
  263. Zarbo RJ., Marunick MT., Johns R.: Malignant ameloblastoma, spindle cell variant. *Arch Pathol Lab Med.* 2003, 127, 3, 352-355.

## 8. STRESZCZENIE

Nowotwory zębopochodne żuchwy i szczęki są rzadką i jednocześnie bardzo zróżnicowaną pod względem klinicznym i histologicznym grupą guzów. Torbiele zębopochodne są najczęstszą zmianą patologiczną rozwijającą w kości szczęki i żuchwy. Nowotwory i torbiele zębopochodne charakteryzują się resorpcją otaczającej kości. Układ RANKL/RANK/OPG reguluje prawidłowe funkcjonowanie i dojrzewanie osteoklastów. Zaburzenie tego układu powoduje patologiczną resorpcję kości. IL-1 $\alpha$  podtrzymuje stan zapalny oraz stymuluje osteoklasty. Metaloproteinazy, a szczególnie MMP-9 uczestniczy w degradacji macierzy kostnej.

Celem pracy była ocena ekspresji głównych mediatorów regulujących powstawanie i różnicowanie osteoklastów i osteoblastów w nowotworach i torbielach zębopochodnych szczęki i żuchwy oraz wyjaśnienie ich roli w procesie niszczenia kości. Zbadanie mechanizmu resorpcji kości w guzach zębopochodnych pomoże w zrozumieniu biologii guza i wskaże kierunki leczenia klinicznego.

Materiał do badań uzyskano od 122 chorych (68 mężczyzn i 54 kobiet w wieku od 9 do 89 lat) z guzami zębopochodnymi leczonych w Klinice Chirurgii Szczykowej i Stomatologicznej GUMed. Grupą kontrolną stanowiły mieszki zębowe uzyskane od 13 chorych w czasie zabiegu dłutowania całkowicie zatrzymanego dolnego trzeciego zęba trzonowego z przyczyn ortodontycznych. Materiał tkankowy został poddany badaniu histopatologicznemu, immunohistochemicznemu i molekularnemu. W badanym materiale tkankowym oceniono ekspresję czynników RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  i MMP-9. Na podstawie wykonanej analizy stwierdzono, że w badanej grupie chorych płeć, wiek, lokalizacja i choroby towarzyszące nie wpływały na ekspresję RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  oraz MMP-9 ( $p > 0,05$ ).

Poziom białka RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  w guzach zębopochodnych i w grupie kontrolnej oceniono na podstawie analizy Western Blot przeprowadzonej na lizatach białkowych uzyskanych z badanych tkanek: 58 torbieli korzeniowych, 9 torbieli zawiązkowych, 2 szkliwiaków, 4 rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych oraz 13 mieszków zębowych.

Ekspresja RANKL w nowotworach i torbielach zębopochodnych znamienne przewyższała ekspresję tego białka niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,002$ ). Ekspresja OPG w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym była istotnie niższa



w mieszkach zębowych ( $p < 0,012$ ). Stwierdzono niewielki wzrost poziomu białka OPG w szkliwiaku, torbieli korzeniowej i torbieli zawiązkowej w porównaniu do grupy kontrolnej, ale nie był on znamieny statystycznie. Znamienne wyższy wzrost ekspresji OPG wykazano w torbieli korzeniowej niż w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym ( $p < 0,050$ ). Stwierdzono istotnie większą ekspresję OPG w torbielach korzeniowych niż w nowotworach zębopochodnych ( $p < 0,013$ ). Stosunek RANKL/OPG w badanych zmianach chorobowych był znamienne wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ). Wykazano, że nie ma istotnej różnicy w stosunku RANKL/OPG pomiędzy torbielami korzeniowymi i zawiązkowymi oraz nowotworami zębopochodnymi. Wykazano znamienne wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,001$ ). Znamienne wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  stwierdzono w torbielach korzeniowych w stosunku do torbieli zawiązkowych ( $p < 0,050$ ). Wykazano istotny wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  w torbielach korzeniowych w stosunku do grupy nowotworów zębopochodnych ( $p < 0,008$ ). Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że IL-1 $\alpha$  może być jednym z istotnych czynników w przebiegu reakcji zapalnej. Stwierdzono silną i istotną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją RANKL i OPG w zmianach chorobowych ( $p < 0,001$ ), szczególnie w torbielach korzeniowych. Może być to być związane z reakcją obronną organizmu na proces lizy kości. Ponadto gdy rósł poziom RANKL, to wzrastał poziom IL-1 $\alpha$ , a korelacja była umiarkowana. Wykazano również, że wraz ze wzrostem poziomu IL-1 $\alpha$  nieznacznie rósł poziom OPG ( $p < 0,001$ ). IL-1 $\alpha$  może być jednym z czynników, który zwiększa poziom zarówno RANKL jak i OPG w przebiegu reakcji zapalnej. Stwierdzono, że w przypadku rozległych nowotworów zębopochodnych (przekraczających 3 cm średnicy) występował znamienne wzrost ekspresji RANKL ( $p < 0,012$ ). Zależność ta była istotna tylko dla nowotworów zębopochodnych, natomiast dla torbieli zębopochodnych nie miała związku. Można przypuszczać, że zwiększonej ekspresji RANKL w nowotworach zębopochodnych towarzyszy większa osteoliza kości.

W badaniu immunohistochemicznym oznaczono ekspresję RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku guzów zębopochodnych szczęki i żuchwy u 82 chorych: 23 szkliwiaków, 32 rogowaciejąco-torbielowatych guzów zębopochodnych i 27 torbieli korzeniowych. Nie odnotowano znamienych różnic w ekspresji RANKL w komórkach nabłonka torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka. W komórkach podścieliska stwierdzono istotnie niższy poziom RANKL w szkliwiaku niż w rogowaciejąco-

torbielowatym guzie zębopochodnym i torbieli korzeniowej ( $p < 0,001$ ). Wykazano znamiennej wzrost ekspresji RANKL w komórkach podścieliska w torbieli korzeniowej w porównaniu do rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego ( $p < 0,024$ ). W przypadku poziomym OPG stwierdzono, że w znamiennej stopniu przewyższa poziom tego białka w komórkach nabłonka ( $p < 0,001$ ) jak i podścieliska ( $p < 0,038$ ) rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego niż szkliwiaka. We wszystkich badanych zmianach zębopochodnych szczęki i żuchwy odnotowano różnice w zakresie H-score pomiędzy ekspresją MMP-9 w obrębie komórek nabłonka a podścieliska. Wykazano znamiennej wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka i podścieliska w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym w porównaniu do torbieli korzeniowej ( $p < 0,001$ ). Wskazuje to na bardziej agresywny charakter zmiany chorobowej. Wzrost ekspresji MMP-9 w komórkach nabłonka rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego był istotnie większy niż w komórkach nabłonka szkliwiaka ( $p < 0,001$ ). Analiza stosunku komórek RANKL-dodatnich i OPG-dodatnich w nabłonku i podścielisku wykazała, że istotnie częściej w nabłonku torbieli korzeniowej, rogowaciejąco-torbielowatego guza zębopochodnego i szkliwiaka ekspresja RANKL była równa ekspresji OPG. Tylko w przypadku szkliwiaka stwierdzono, że w komórkach podścieliska ekspresja RANKL była zamiennie większa od ekspresji OPG (RANKL > OPG) ( $p < 0,001$ ). Wysoki poziom OPG w podścielisku wykazano głównie w torbielach zapalnych (48,15%) i rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych (46,88%). W szkliwiaku stwierdzano najczęściej brak ekspresji OPG w podścielisku (36,36%) lub niski poziom (27,27%).

Nie wykazano znamienych różnic w poziomie RANKL, OPG i MMP-9 w nabłonku i podścielisku pomiędzy typami szkliwiaków.

W grupie badanej (nowotworów zębopochodnych i torbieli korzeniowych) wykazano dodatnie korelacje pomiędzy poziomem RANKL w nabłonku i w podścielisku ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,4$ ), OPG w nabłonku i w podścielisku ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,6$ ), MMP-9 w nabłonku a MMP-9 i podścielisku ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,5$ ). Ponadto stwierdzono dodatnie korelacje pomiędzy: ekspresją RANKL w nabłonku a ekspresją OPG w nabłonku ( $p < 0,031$ ;  $r = 0,3$ ), ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w nabłonku ( $p < 0,010$ ;  $r = 0,3$ ), ekspresją RANKL w torebce a ekspresją OPG w torebce ( $p < 0,014$ ;  $r = 0,3$ ), ekspresją MMP-9 w nabłonku a ekspresją OPG w nabłonku ( $p < 0,033$ ;  $r = 0,2$ ), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją RANKL w torebce ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,4$ ), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją

OPG w torebce ( $p < 0,003$ ;  $r = 0,3$ ), ekspresją MMP-9 w torebce a ekspresją OPG w nabłonku ( $p < 0,004$ ;  $r = 0,6$ ).

Poziom białka RANKL w nabłonku dodatnio korelował z poziomem RANKL w podścielisku: najsilniej w szkliwiakach ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,8$ ), umiarkowanie w rogowaciejąco-torbielowatych guzach zębopochodnych ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,6$ ) i słabo w grupie torbieli korzeniowych ( $p < 0,031$ ;  $r = 0,4$ ).

Może to sugerować, że ekspresja RANKL i OPG jest ze sobą dodatnio sprzężona szczególnie w rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym. Wykazano, że ekspresja MMP-9 i RANKL oraz MMP-9 i OPG były ze sobą dodatnio sprzężone i mogą zwiększać ekspresję zarówno RANKL, OPG jak i MMP-9 w przypadku osteolizy. Ponadto poziom białek MMP9 i OPG może być jednym z czynników, który zwiększa ekspresję zarówno OPG jak i MMP-9 w osteolizie kości.

Zwiększona ekspresja RANKL, MMP-9 i IL-1 $\alpha$  oraz zaburzenie stosunku RANKL/OPG w szkliwiaku, rogowaciejąco-torbielowatym guzie zębopochodnym, torbieli korzeniowej i zawiązkowej świadczy o wpływie tych białek na powstawanie ubytków kostnych. Wykrycie silnej ekspresji RANKL i MMP-9 we wszystkich próbkach prowadzi do stwierdzenia, iż te białka odgrywają podstawową rolę w rozwoju i progresji guza. Wzrost ekspresji IL-1 $\alpha$  w guzach zębopochodnych wpływa na wzrost aktywności czynnika RANKL prowadzącego do intensyfikacji procesu różnicowania osteoklastów. Wzrost ekspresji OPG w nowotworach i torbielach zębopochodnych może świadczyć o reakcji obronnej organizmu przed degradacją kości. Wzrost ekspresji RANKL w nowotworach zębopochodnych zwiększa osteolizę kości.

Uzyskane wyniki badań immunohistochemicznych i molekularnych świadczą o wpływie RANKL, OPG i IL-1 $\alpha$  i MMP-9 na przebieg procesu resorpcji kości w szczęce i żuchwie w nowotworach i torbielach zębopochodnych.

Wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć znaczenie w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych nowotworów i torbieli zębopochodnych szczęki i żuchwy.

## 9. SUMMARY

Odontogenic tumours of mandible and maxilla are rare and constitute heterogeneous group of tumours with diverse clinical manifestations and histological features. Odontogenic cysts are the most common pathological lesions developing in jaws. Odontogenic neoplasms and cysts are characterized by resorption of surrounding bone. RANKL/RANK/OPG system regulates normal function and maturation of osteoclasts. Disturbances of this system causes pathological bone resorption. IL-1 $\alpha$  sustains inflammatory process and stimulates osteoclasts. Metalloproteinases, particularly MMP-9 take part in destruction of bone matrix.

The aim of the study was to analyse the expressions of main regulatory mediators of development and differentiation of osteoclasts and osteoblasts, in odontogenic neoplasms and cysts of jaws and evaluation of their roles in the process of bone destruction. To study the bone resorption mechanism of ameloblastoma will help to further understand the tumour's biological behaviour and thereby provide directions for clinical treatment.

Material was collected from 122 patients (68 men and 54 women, 9-89 years of age) with odontogenic tumours treated in Maxillofacial and Oral Surgery Department of Medical University of Gdańsk. Control group comprised dental follicles obtained from 13 patients during odontectomy of impacted lower third molar due to orthodontic reasons. Histological, molecular and immunohistochemical evaluation was performed on the tissue material. In analysed samples expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and MMP-9 was determined. The results of carried out multivariate analysis revealed that patients' sex and age, localization and concomitant diseases, did not affect the expression of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and MMP-9 ( $p > 0.05$ ) in analysed group of patients. RANKL, OPG and IL-1 $\alpha$  proteins level in odontogenic tumours and in the control group was determined with Western Blot analysis carried out on protein lysates obtained from examined tissues: 58 radicular cysts, 9 dentigerous cysts, 2 ameloblastomas, 4 keratocystic odontogenic tumours and 12 dental follicles.

The expression of RANKL in odontogenic neoplasms and cysts was significantly higher than the expression of this protein in the control group ( $p < 0.002$ ). The expression of OPG in keratocystic odontogenic tumour was significantly lower than in dental follicles ( $p < 0.012$ ). The slight increase of the OPG protein level was found in ameloblastoma, radicular cyst and in dentigerous cyst compared with the control group, but it was not statistically significant. Significantly

higher increase of the OPG expression was found in radicular cyst than in keratocystic odontogenic tumour ( $p < 0.050$ ). The OPG expression was significantly higher in radicular cysts than in odontogenic neoplasms ( $p < 0.013$ ). RANKL/OPG ratio in analysed lesions was significantly higher comparing with the control group ( $p < 0.001$ ). There were no significant difference between radicular cysts and dentigerous cysts, as well as odontogenic neoplasms. Significant increase of the expression of IL-1 $\alpha$  was found in the analysed group comparing with the control group ( $p < 0.001$ ). Significant increase of the expression of IL-1 $\alpha$  was found in radicular cysts comparing with dentigerous cysts ( $p < 0.050$ ). Significant increase of the expression of IL-1 $\alpha$  was revealed in radicular cysts comparing with odontogenic neoplasm group ( $p < 0.008$ ). On the basis of these findings it can be suggested that IL-1 $\alpha$  may be one of the important factors in the course of inflammatory reaction. Strong and significant positive correlation between the expression of RANKL and the expression of OPG was found in pathological lesions ( $p < 0.001$ ), particularly in radicular cysts. It could be associated with defence reaction to the bone resorption process. Moreover, the slight increase of IL-1 $\alpha$  level in cases where the increase of the level of RANKL was observed, with moderate correlation between them. Along with the elevation of IL-1 $\alpha$ , slight increase of the expression of OPG was noted ( $p < 0.001$ ). IL-1 $\alpha$  may be one of factors, which elevate both the level of RANKL and of OPG, in the course of inflammatory reaction. In cases of larger odontogenic neoplasms with diameter exceeding 3 cm, significant increase of the expression of RANKL was found ( $p < 0.012$ ). This correlation was significant only in cases of odontogenic neoplasms. In odontogenic cysts there were no such correlation. It may be suggested, that the higher expression of RANKL in odontogenic neoplasms is associated with increased bone osteolysis.

The expression of RANKL, OPG and MMP-9 in epithelium and stroma of odontogenic tumours of jaws in 82 patients: 23 ameloblastomas, 32 keratocystic odontogenic tumours and 27 radicular cysts were evaluated in immunohistochemical examinations. There were no significant differences of the expression of RANKL in epithelial cells of radicular cyst, keratocystic odontogenic tumour and ameloblastoma. The study revealed significantly lower level of RANKL in stromal cells of ameloblastoma than in stromal cells of keratocystic odontogenic tumour and radicular cyst ( $p < 0.001$ ). Significant increase of the expression of RANKL in stromal cells in radicular cyst comparing with keratocystic odontogenic tumour was found ( $p < 0.024$ ). With regard to the OPG level, the expression

of this protein was significantly higher in epithelial cells ( $p < 0.001$ ), as well as in stromal cells ( $p < 0.038$ ) of keratocystic odontogenic tumour than in ameloblastoma. In all analysed odontogenic lesions of maxilla and mandible, the significant differences in H-scores of the expression of MMP-9 between epithelial and stromal cells were found. Significant increase of the expression of MMP-9 in epithelial cells and in stroma of keratocystic odontogenic tumour comparing with radicular cyst ( $p < 0.001$ ) was revealed. This result suggests more aggressive character of this lesion. Increase of the expression of MMP-9 in epithelial cells of keratocystic odontogenic tumour was significantly higher than in epithelial cells of ameloblastoma ( $p < 0.001$ ). Analysis of the RANKL-positive/OPG-positive ratio in the epithelium and stroma revealed significantly more frequent presence of the equal expressions of RANKL and OPG in epithelium of radicular cyst, keratocystic odontogenic tumour and ameloblastoma. Only in stromal cells in case of ameloblastoma the expression of RANKL was significantly higher than the expression OPG (RANKL > OPG) ( $p < 0.001$ ). High level of OPG in stroma was found in inflammatory cysts (48.15%) and keratocystic odontogenic tumours (46.88%) predominantly. Ameloblastomas in majority revealed lack of the expression of OPG in stroma (36.36%) or had low level of OPG (27.27%).

There were no significant differences in RANKL, OPG and MMP-9 levels in epithelium and stroma between types of ameloblastoma.

In the analysed group (odontogenic neoplasms and radicular cysts) positive correlations were found between: the expression of RANKL in epithelium and the expression of RANKL in stroma ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.4$ ), the expression of OPG in epithelium and the expression of OPG in stroma ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.6$ ), the expression of MMP-9 in epithelium and the expression of MMP-9 in stroma ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.5$ ). Furthermore, consecutive positive correlations: between the expression of RANKL in epithelium and the expression of OPG in epithelium ( $p < 0.031$ ;  $r = 0.3$ ), between the expression of RANKL in stroma and the expression of OPG in epithelium ( $p < 0.010$ ;  $r = 0.3$ ), between the expression of RANKL in stroma and the expression of OPG in stroma ( $p < 0.014$ ;  $r = 0.3$ ), between the expression of MMP-9 in epithelium and the expression of OPG in epithelium ( $p < 0.033$ ;  $r = 0.2$ ), between the expression of MMP-9 in stroma and the expression of RANKL in stroma ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.4$ ), between the expression of MMP-9 in stroma and the expression of OPG in stroma ( $p < 0.003$ ;  $r = 0.3$ ), between the expression

of MMP-9 in stroma and the expression of OPG in epithelium ( $p < 0.004$ ;  $r = 0.6$ ) were found.

Level of protein of RANKL in epithelium was positively correlated with the level of RANKL in stroma. The strongest correlation in ameloblastomas ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.8$ ), moderate correlation in keratocystic odontogenic tumours ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.6$ ) and low correlation in the group of radicular cysts ( $p < 0.031$ ;  $r = 0.4$ ) was found.

This finding may suggest that the expressions of RANKL and OPG are positively correlated, particularly in keratocystic odontogenic tumour. The positive correlation between the expression of MMP-9 and RANKL and between the expression of MMP-9 and OPG were found. Furthermore, the expression of MMP-9 and OPG may be one of mediators, which increase the expression of OPG, as well as the expression of MMP-9 in osteolysis.

Increased expression of RANKL, MMP-9 and IL-1 $\alpha$  and imbalance of RANKL/OPG ratio in ameloblastoma, keratocystic odontogenic tumour, radicular cyst and dentigerous cyst indicates the influence of these proteins on the bone resorption. The finding of strong expressions of RANKL and MMP-9 in all analysed samples indicates that these proteins play essential role in development and progression of tumour. The increase of the expression of IL-1 $\alpha$  in odontogenic neoplasms and odontogenic cysts stimulates the increase of RANKL factor activity leading to the intensification of the process of osteoclasts differentiation. Increase of the expression of OPG in odontogenic neoplasms and cysts may be indicative of the defence reaction to the bone resorption. The increase of the expression of RANKL in odontogenic neoplasms increases bone osteolysis. Immunohistochemical and molecular results of this study may demonstrate the influence of RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$  and MMP-9 on the course of bone resorption in maxilla and mandible in odontogenic neoplasms and cysts.

The results of the performed study may be valuable in development of new therapeutic strategies in odontogenic neoplasms and cysts of jaws.