

Regulatory osteoklastogenezy w perlaku ucha środkowego

Regulators of osteoclastogenesis in middle ear cholesteatoma

EWA OLSZEWSKA ^{1/}, SŁAWOMIR OLSZEWSKI ^{2/}, ANDRZEJ SIEŚKIEWICZ ^{1/}, MAŁGORZATA BORZYM-KLUCZYK ^{2/}, BOGDAN ŁAZARCZYK ^{3/}, HOLGER SUDHOFF ^{4/}

^{1/} Klinika Otolaryngologii Akademii Medycznej w Białymstoku

^{2/} Zakład Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Białymstoku

^{3/} Oddział Laryngologii SPZOZ Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. J.M. Śniadeckiego w Białymstoku

^{4/} Klinika Otolaryngologii Uniwersytetu Zagłębia Ruhry, Bochum, Niemcy

Wprowadzenie. Jedną z cech destrukcyjnej natury perlaka jest resorpcja kości. Osteoklastogeneza i resorpcja kości są kontrolowane przez równowagę pomiędzy RANK (*receptor activator of NF-κB*) i jego ligandu (RANKL) znanego również jako OPGL (*osteoprotegerin ligand*).

Cel pracy. Oznaczenie ekspresji i dystrybucji regulatorów osteoklastogenezy (OPGL, *osteoprotegerin* – OPG, *macrophage-colony stimulating factor* – M-CSF) w perlaku ucha środkowego u dorosłych.

Materiał i metoda. Przeprowadzono immunohistochemiczną analizę 28 wycinków perlaka ucha środkowego i 28 wycinków zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego (psz) z przeciwciałami anty-OPG, anty-OPGL oraz anty-M-CSF stosując standardową metodę peroksydazową ze znakowaniem streptawidyną. W celu oceny OPGmRNA, OPGLmRNA i M-CSFmRNA zastosowano reakcję łańcuchową polimerazy z odwróconą transkrypcją (*reverse transcription-polymerase chain reaction* – RT-PCR).

Wyniki. W wycinkach zdrowej skóry psz obserwowano słabo pozytywną reakcję z przeciwciałami przeciwko OPG, OPGL i M-CSF, głównie w warstwie podnabłonkowej. Wszystkie wycinki perlaka wykazały natomiast pozytywną reakcję w badaniu immunohistochemicznym przeciwko tym przeciwciałom, zlokalizowaną w perimatrix perlaka. Obecność M-CSF mRNA oraz OPG mRNA stwierdzono we wszystkich próbkach skóry psz. Ekspresję OPGL mRNA obserwowano w 11 z 16 tych próbek. We wszystkich wycinkach perlaka w RT-PCR potwierdzono obecność OPGmRNA, OPGLmRNA oraz M-CSFmRNA.

Wnioski. Wyniki badań wskazują na istotną rolę cytokin M-CSF, OPGL i OPG w regulacji osteoklastogenezy w tkankach perlaka ucha środkowego.

Słowa kluczowe: perlak ucha środkowego, osteoklastogeneza, OPG, OPGL, M-CSF, RT-PCR

Introduction. Bone resorption constitutes one of the destructive characteristics of cholesteatoma. Osteoclastogenesis and bone resorption are controlled by a balance between two factors: the receptor activator of NF-κB (RANK) and its ligand (RANKL) also known as osteoprotegerin ligand (OPGL).

Aim. Investigate the expression and distribution of regulators of osteogenesis in human middle ear cholesteatoma and external auditory meatus skin.

Material and methods. Specimens of human cholesteatoma (n=28) and normal meatal skin (n=28) were analysed by immunohistochemistry. All cholesteatoma samples were removed during surgery for chronic otitis media. Immunohistochemistry was performed using the labelled streptavidin peroxidase method. RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) was used to detect OPGmRNA, OPGLmRNA and M-CSFmRNA.

Results. The results of immunohistochemical staining reactions with OPG, OPGL and M-CSF antibodies show weakly positive reaction in the subepithelial tissue of normal auditory meatal skin. The results of immunohistochemical staining reactions revealed definitely positive reaction with OPG, OPGL, and M-CSF within cholesteatoma perimatrix. RT-PCR revealed the presence of M-CSF mRNA and OPG mRNA in all investigated samples of normal meatal skin. OPGL expression was found positive in 11 of 16 samples of normal meatal skin. OPG, OPGL, and M-CSFmRNA were detected in all investigated samples of cholesteatoma tissue.

Conclusions. Our results point to an important role of M-CSF, OPGL, OPG cytokins in the regulation of osteoclastogenesis within the cholesteatoma tissues of the middle ear.

Key words: middle ear cholesteatoma, osteoclastogenesis, OPG, OPGL, M-CSF, RT-PCR

Nadesłano: 13.09.2005

Oddano do druku: 19.07.2006

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Ewa Olszewska

Klinika Otolaryngologii Akademii Medycznej

ul. Skłodowskiej 24 A, 15-276 Białystok

tel.: (85) 746 82 69, fax: (85) 746 86 97; e-mail: ewasan@wp.pl

WSTĘP

Perlak ucha środkowego niszczy struktury ucha środkowego i wewnętrznego prowadząc do utraty słuchu, dysfunkcji przedsionkowej, porażenia nerwu twarzowego, jak również powikłań wewnątrzczaszkowych [1]. Jedną z cech perlaka jest resorpcja kości w obszarze przylegającym do perimatrix. Resorpcja kości jest podstawowym procesem biologicznym występującym zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych [2]. Podczas procesu zapalnego uwalniane są czynniki

takie jak: IL1 α , IL1 β , TNF α , interferon β [3]. Przed czterema laty wykazano, że przebudowa kości, jak i jej utrata, kontrolowane są przez równowagę uwalniania dwóch innych czynników: RANK (*receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B*) i jego ligandu RANKL, znanego również jako OPGL (*osteoprotegerin ligand*) [4]. RANKL aktywuje dojrzałe osteoklasty *in vitro* i prowadzi do resorpcji kości *in vivo* poprzez aktywowanie już istniejących osteoklastów [5,6]. Ścisły kontakt pomiędzy komórkami zrębu i szpiku kostnego ma zasadnicze znaczenie w procesie osteogenezy. Obecnie wiadomo, że układ ten umożliwia produkcję dwóch czynników hematopoetycznych, które są konieczne do osteoklastogenezy: wspomniany RANKL oraz M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*) [7,8]. Natomiast do późniejszej aktywacji osteoklastogenezy niezbędne jest białko RANK obecne na powierzchni komórek prekursorowych [9,10]. Przełomem w rozumieniu regulowania procesów osteogenezy stała się identyfikacja OPG (*osteoprotegerin*) – rozpuszczalnego białka związanego z TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), które blokuje formację osteoklastów *in vitro* oraz resorpcję kości *in vivo* [4].

Celem pracy było oznaczenie ekspresji i dystrybucji kluczowych regulatorów osteoklastogenezy (OPG, OPGL, M-CSF) w perlaku ucha środkowego u dorosłych za pomocą metod immunohistochemicznych oraz reakcji łańcuchowej polimerazy z odwróconą transkryptazą (*reverse transcription-polymerase chain reaction – RT-PCR*).

MATERIAŁ I METODY

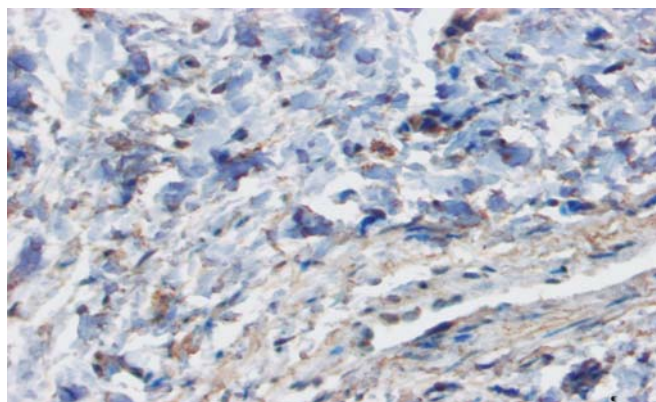
Do badań immunohistochemicznych użyto 28 perlaków pobranych od dorosłych pacjentów podczas zabiegu operacyjnego, wykonywanego z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego z perlakiem. Wiek chorych wahał się od 40 do 65 lat. Preparaty po utrwaleniu w 8% buforowanej formalinie zatapiano w kostki parafinowe, cięto seryjnie na skrawki o grubości 5 μ m, a następnie w sposób rutynowy barwiono hematoksyliną i eozyną. W badaniach immunohistochemicznych zastosowano standardową metodę peroksydazową ze znakowaniem streptawidyną. Kontrolę stanowiło 28 wycinków zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego pobranych podczas tego samego zabiegu. Wycinki skóry poddano tej samej analizie immunohistochemicznej. Ocena intensywności barwienia immunohistochemicznego dokonana została przez dwóch niezależnych badaczy. Za negatywny wynik reakcji przyjęto brak komórek z ekspresją badanych białek, słabo pozytywny – mniej niż 5% komórek z ekspresją badanych białek (komórki takie nazwano komórkami dodatnimi), wyraźnie pozytywną – 5-75% komórek (dodatnich) oraz silnie dodatnią – >75% komórek (dodatnich). Do tych obliczeń zastosowano automatyczny system analizujący (KS300, Kontron Elektronik, Köhn, Niemcy).

Ekstrakcję całkowitego, komórkowego RNA badano z zastosowaniem zestawu RNeasy Midi/Mini kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z instrukcją (pełny opis u autorów). cDNA uzyskano z 1g całkowitego RNA w wyniku zastosowania hemameru oraz systemu syntetyzującego (SuperScript First-Strand Synthesis System GIBCO-BRL, Paisley, Wielka Brytania). Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzono w automatycznym, termicznym układzie (Personal Cycler, Biometria, Göttingen, Niemcy). Wszystkie reakcje łańcuchowe polimerazy zakończono w temperaturze 72°C przez 7 minut dla OPG i M-CSF oraz 15 minut dla OPGL. Zastosowano elektroforezę na 2% żelu agarowym w celu określenia specyficzności produktów PCR (Amresco, Niemcy).

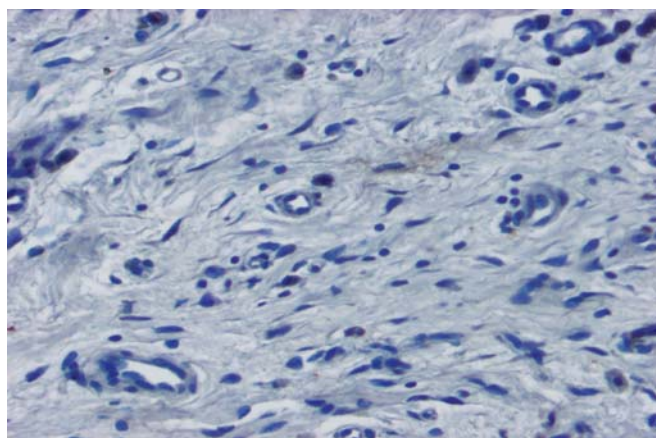
WYNIKI

W wycinkach skóry z przewodu słuchowego zewnętrznego obserwowano słabo pozytywną reakcję z przeciwciałami przeciwko OPG, OPGL (ryc. 1) i M-CSF (ryc. 2) [$< 5\%$ komórek (dodatnich)]. Ekspresję tych komórek obserwowano głównie w warstwie podnabłonkowej.

Wszystkie wycinki perlaka wykazywały pozytywną reakcję w badaniu immunohistochemicznym przeciwko

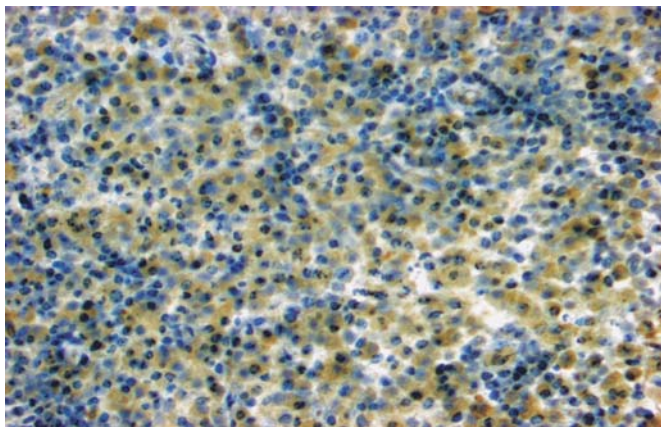


Ryc. 1. Skóra przewodu słuchowego zewnętrznego. Pojedyncze komórki ze słabą ekspresją anti-OPG w warstwie podnabłonkowej. Powiększenie x400

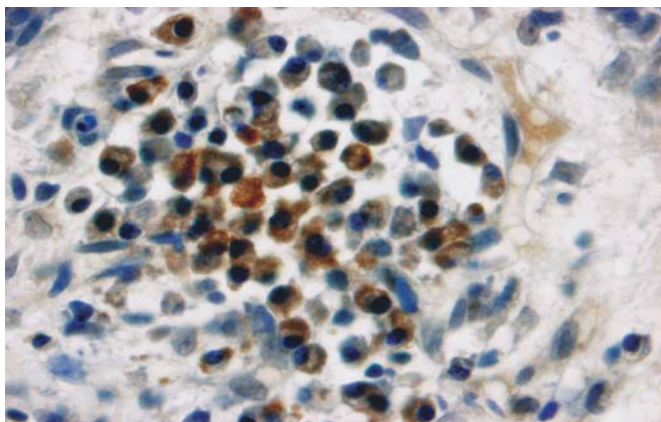


Ryc. 2. Skóra przewodu słuchowego zewnętrznego. Niewielka liczba komórek ze słabą ekspresją anti-M-CSF. Powiększenie x400

przeciwciałom OPG, OPGL i M-CSF. Reakcja zlokalizowana była w warstwie podnabłonkowej perlaka (perimatrix). Była to słabo pozytywna reakcja [$< 5\%$ komórek (dodatnich)] w stosunku do przeciwciał przeciwko OPG oraz wyraźnie pozytywna w stosunku do anti-OPGL (ryc. 3) i anti-M-CSF (ryc. 4).



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy perlaka. Dodatnie komórki anti-OPGL w perimatrix perlaka. Powiększenie x200



Ryc. 4. Perlak. Liczne komórki anti-M-CSF dodatnie z jądrami wybarwionymi na kolor brązowy, widoczne w perimatrix perlaka. Powiększenie x400

Skóra przewodu słuchowego zewnętrznego

Obecność M-CSFmRNA oraz OPGmRNA stwierdzono we wszystkich próbkach skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. Natomiast ekspresję OPGL obserwowano w 11 z 16 badanych próbek.

Perlak ucha środkowego

We wszystkich 17 badanych wycinkach perlaka w RT-PCR potwierdzono obecność OPGmRNA, OPGLmRNA oraz M-CSFmRNA.

DYSKUSJA

Perimatrix perlaka wykazuje dużą aktywność w procesie destrukcji kości. Przewlekły stan zapalny prowadzi do wzmocnienia aktywności osteoklastów uwolnionych przez interleukinę-1, TNF- α oraz uwolnione z keratynocytów cytokiny [11,12]. Wynikiem procesu resorpcyj-

nego jest macierz kostna bezpostaciowa, zawierająca niezorganizowane włókna kolagenu [13,14]. W procesie przebudowy kości główną rolę odgrywają osteoblasty i osteoklasty. Osteoblasty odpowiedzialne są za tworzenie się zewnątrzkomórkowej macierzy, która składa się głównie z kolagenu I (90%) oraz w około 10% – z białek niekolagenowych [15]. Interakcje pomiędzy komórkami podścieliska i osteoblastami są niezbędne w procesie osteoklastogenezy zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Osteogeneza łączy serię zdarzeń inicjowanych przez nabór prekursorowych komórek pochodzących z mononuklearnego szpiku kostnego. Następnie w wyniku wielojądrzistości tych komórek stają się one osteoklastami, które są zdolne do resorpcji organicznych i nieorganicznych składników macierzy kostnej. W kości przylegającej do perlaka zachodzą zmiany strukturalne takie jak: nieciągła okostna, puste laguny, nieregularne linie kostniwa, pojawienie się eozynofilnych pęcherzyków w obszarze między kością i perlakiem. Immunohistochemiczne badania wykazały brak obecności białek niekolagenowych w kości zaatakowanej przez perlak, co może wynikać z bezpośredniego wpływu perlaka na osteoblasty [15]. Podczas procesu dojrzewania, osteoblasty różnicują się z mezenchymalnych komórek macierzystych, natomiast osteoklasty – z hematopoetycznych prekursorowych komórek makrofagów. Osteoklasty są zdolne do resorpcji składników organicznych i nieorganicznych macierzy kostnej i pobudzone przez wiele czynników procesu zapalnego [16,17].

W naszym badaniu wykazaliśmy wyraźnie zwiększoną ekspresję białek biorących udział w procesie resorpcji kości. OPG jest rozpuszczalnym białkiem związanym z TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), które hamuje formacje osteoklastów *in vitro* oraz resorpcję kości *in vivo*. Ekspresja tego białka w badanym materiale perlaka była słaba, co może świadczyć o receptorowej regulacji w dół w obrębie perimatrix. Natomiast Tsurukai i wsp. oraz Udagawa i wsp. uważają, że OPGL oraz M-CSF należą do głównych czynników uczestniczących w procesie tworzenia komórek prekursorowych osteoklastów i samych osteoklastów [18,19]. Polipeptyd RANKL *in vivo* i *in vitro* przedłuża życie dojrzałych osteoklastów [20,21]. Oba te białka obserwowano w perimatrix perlaka. Ich ekspresja była wyraźnie większa w porównaniu do zdrowej skóry przewodu słuchowego zewnętrznego. A zatem można przypuszczać, że uwolnienie OPGL z aktywnych komórek T podczas procesu zapalnego pobudza osteoklastogenezę oraz osteoklastyczną resorpcję kości w perlaku. Stan zapalny związany z perlakiem indukuje resorpcję kości poprzez uwolnienie OPGL z aktywowanych komórek T i wywołuje osteogenezę. W prezentowanym badaniu wykazaliśmy obecność OPGmRNA, OPGLmRNA oraz M-CSFmRNA we wszystkich próbkach perlaka a w związku z tym udział perlaka w procesie resorpcji kości.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest techniką umożliwiającą amplifikację fragmentów DNA *in vitro* przy użyciu polimerazy DNA. RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) jest czułą techniką detekcji mRNA. Na podstawie badań histochemicznych prowadzonych przez Chodynckiego i wsp. przypuszcza się, że resorpcja i destrukcja tkanki kostnej powodowana jest m.in. przez enzymy lizosomalne, takie jak katepsyny A, B, D i E [22]. Inne mechanizmy dotyczące destrukcji kości przez perlak, to również: przewlekła infekcja prowadząca do stanu zapalnego kości, zmiany pH, aktywność osteoklastów pobudzonych przez interleukinę-1, TNF- α oraz uwolnione z keratynocytów cytokiny [14]. Wykazano, że pH reszt keratynowych w obrębie perlaka jest kwaśne, a zatem takie środowisko przy-

czynia się do demineralizacji hydroksyapatytów kości, prowadząc w rezultacie do jej destrukcji [23].

Dalsze badania nad wykazaniem udziału innych czynników regulacji osteoklastogenezy w perlaku przyczyni się do pełnego zrozumienia tego złożonego procesu i stworzy możliwości poszukiwania sposobów hamowania lub nawet przeciwdziałania tak destrukcyjnej działalności perlaka.

WNIOSKI

1. Proces zapalny indukuje resorpcję kości poprzez uwalnianie: M-CSF i OPGL i wywołuje osteogenezę.
2. Badane cytokiny (M-CSF, OPGL, OPG) biorą udział w regulacji osteoklastogenezy.

Piśmiennictwo

1. Chole RA. The molecular biology of bone resorption due to chronic otitis media. *Ann NY Acad Sci* 1997; 830: 95-109.
2. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C i wsp. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphnode organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-323.
3. Bujia J, Kim C, Ostos P, Sudhoff H, Kastenbauer E, Hultner L. Interleukin-1(IL-1 α) and IL-1-receptor antagonist (IL-1-RA) In middle ear cholesteatoma: an analysis of protein production and biological activity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253: 252-255.
4. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055.
5. Burgess T, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C i wsp. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145 (3): 527-538.
6. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF- α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* 2002; 143: 1108-1118.
7. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T i wsp. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
8. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S i wsp. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (7): 3597-3602.
9. Nakagawa N, Kinosaki 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.
10. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E i wsp. 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.
11. Amar SW, Wishahi HF, Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1996; 110: 534-539.
12. Schonermark M, Mester B, Kempf MG, Blaser J, Tschesche H, Lenarz T. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in human cholesteatomas. *Acta Otolaryngol* 1996; 116(3): 451-456.
13. Chole RA. Osteoclasts in chronic otitis media, cholesteatoma, and osteosclerosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97: 661-666.
14. Uno Y, Saito R. Bone resorption in human cholesteatoma: morphological study with scanning electron microscopy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 463-468.
15. Cinamon U, Kronenberg J, Benayahu D. Structural changes and protein expression in the mastoid bone adjacent to cholesteatoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 1198-1203.
16. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.
17. Cheshire IM, Blight A, Ratcliffe WA, Proops DW, Heath DA. Production of parathyroid-hormone-related protein by cholesteatoma cells in culture. *Lancet* 1991; 338: 1041-1043.
18. Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoblast differentiation factor in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 2000; 18(4): 177-184.
19. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K i wsp. Osteoblasts/stroma cells stimulate osteoblast activation through expression of osteoblast differentiation factor/RANK but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappaB ligand. *Bone* 1999; 25(5): 517-523.
20. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W i wsp. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2000; 157(2): 435-448.
21. Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N i wsp. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 1999; 163(1): 434-442.
22. Chodyncki S, Worowski K, Borawska B. Udział enzymów proteolitycznych w patogenezie perlaka. *Otolaryngol Pol* 1999; suppl. 30: 300-301.
23. Ohsaki K, Yamashita S, Fujita A, Masuda Y, Ueda S, Sugiura T i wsp. Mechanism of bone destruction due to middle ear cholesteatoma as revealed by laser-Raman spectrometry. *Am J Otolaryngol* 1988; 9(3): 117-126.