

# Periferel Dev Hücreli Granülomalarda Nükleer Faktör Kappa Beta (NF-KB) Sinyal Yolağının Aktivitesinin Araştırılması

## *Detection of the Activation of Nuclear Factor Kappa Beta (NF-KB) Signalization Pathway in Peripheral Giant Cell Granulomas*

Ömür DERECİ

### Özet

İnflamatuar gen anlatımında çok büyük rolü olan nükleer faktör kapp beta (NF-KB) sinyal sisteminin periferel dev hücreli granülomalarda aktif olup olmadığını araştırmak, böylece bu lezyonların oluşumlarının inflamatuar bir patogeneze köken alıp almadığı konusunda fikir sahibi olabilmektir. Retrospektif olarak elde edilmiş 29 vakanın klinik bilgileri incelenip, parafin bloklardan elde edilen yeni kesitler üzerinde immunohistokimyasal NF-KB boyaması yapıldı. Tüm vakaların % 97'sinde şiddetli ve orta şiddetli boyanma tespit edildi. Bütün vakalarda NF-KB aktivasyonu gözlemlendi. NF-KB sinyal yolağının periferel dev hücreli lezyonlarda aktif olması bu lezyonların inflamatuar kökenli patolojiler olduğunu göstermektedir. Gelecek çalışmalarda NF-KB sinyal sisteminin ilaçlarla modifiye edilmesi ile bu lezyonlara karşı durdurucu tedavi stratejileri geliştirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Periferel dev hücreli granüloma, dev hücre, osteoklast tipi dev hücre, nükleer faktör kapp beta

### Abstract

The aim of this study is to detect the activity of NF-KB signalization system in peripheral giant cell granulomas in order to determine the origin of the pathogenesis of the lesion. The clinical data and paraffin blocks of twenty nine cases of peripheral giant cell granuloma were retrieved from the archives. Glass slides were prepared from retrieved paraffin blocks and subsequently immunostained with NF-KB antibody. 97 % of the selected cases were highly or moderately stained with NF-KB immunostaining. All cases showed reactivity with NF-KB immunostain. The detection of the activation of NF-KB pathway in peripheral giant cell granulomas suggest that these lesions may have an inflammatory origin. In future studies, modification of NF-KB pathway with drugs may reduce the growth potential or prevent the occurrence of the peripheral giant cell granuloma.

**Key words:** Peripheral giant cell granuloma, giant cell, osteoclast like giant cell, nuclear factor kapp beta

Çenelerde görülen dev hücreli granülomlar ilk defa çenelerin reperatif granülomları adı altında Jaffe tarafından tanımlanmıştır.<sup>1</sup> Dev hücreli granülomlar çene kemiklerinin içinde veya kemik dışı yumuşak dokularda ortaya çıkmalarına bağlı olarak santral ve periferik olarak isimlendirilmektedir.

Periferik dev hücreli granülomla (PDHG) oral dokularda sınırlı, tümör benzeri gingival-mukozal büyüme şeklinde gözlenir. Oral kavitenin göreceli olarak yaygın bir lezyonudur.<sup>2</sup> PDHG yumuşak veya sert kıvamlı, kanamalı görünümde olabilen, rengi kırmızıdan açık pembeye değişen ekzofitik kitle oluşturur. Nadir olarak servikal kemik rezorpsiyonu yapabilmektedir.<sup>3</sup>

Hücrede transkripsiyonel aktivasyonu sağlayan çeşitli iyi tanımlanmış sinyalizasyon yolları mevcuttur. Bu yollar arasında nükleer faktör-KB (NF-KB) sinyal yolağı aktivasyonundaki çabukluk, regülasyonundaki düzenlilik ve şu andaki anlayış sınırlarımız dahilinde ayrıntılı moleküler yapılarındaki ve yönettiği fizyolojik fonksiyonlardaki çeşitlilik açısından çok önemli ve benzersiz bir sinyalizasyon yolağıdır.<sup>4</sup> NF-KB ilk defa 1986 yılında immunoglobulin (Ig)K hafif zincir geninin aktive edici bölgesine bağlı bir nükleer faktör olarak tanımlanmıştır ve özellikle B hücrelerinde ekspres olduğu gözlenmiştir.<sup>5</sup> Ancak yapılan çalışmalarda NF-KB'nin hemen hemen her hücre tipinde var olduğu, sitoplazmada spesifik inhibitörlere (IKB) bağlı olarak inaktif formda olduğu anlaşılmıştır.<sup>4,6</sup> Yakın zamanda yapılan çalışmalarda NF-KB disregülasyonunun AIDS, ateroskleroz, astım, artrit, diabet, inflammatuar bağırsak hastalığı, inme ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalıkta rol oynadığı anlaşılmıştır.<sup>7</sup>

PDHG mikroskopik olarak kollajen ve vasküler bir stroma içinde dağılmış halde bulunan iğsi veya ovoid şekilli mononükleer ve lezyonun değişik bölgelerinde değişik yoğunlukta gözlenen osteoklast benzeri multinükleer hücrelerden oluşan, inflammatuar komponentin belirgin olduğu reaktif bir lezyondur.<sup>8,9</sup> Ancak lezyonun inflammatuar veya tümoral kökenden gelişip gelişmediği tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada seçilmiş periferik dev hücreli lezyonlarda inflamasyonun en önemli başlatıcısı olan NF-KB ekspresyonu incelenmiş ve lezyonun inflammatuar kökenli olup olmadığı araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 2000-2008 yılları arasında GATA Patoloji Anabilim dalı arşivlerinden periferik dev hücre-

li granülomla tanısı almış 29 vaka dahil edilmiştir. Klinik bilgilerine kısmi olsa da ulaşılamayan ve parafin blokları yetersiz olan vakalar çalışma dışı bırakılmıştır. Vakalara ait klinik bilgiler Tablo 1. 'de gösterilmiştir.

## İmmunohistokimyasal boyama

Arşivlerden çıkarılan parafin bloklardan mikrotom ile taze kesitler alındı. Örnekler cam lamalar üzerine alındıktan ve rutin laboratuvar işlemlerinden sonra immünohistokimyasal boyanmaya hazır hale getirildi.

Kesitlerde NF-KB sinyal yolağı aktivasyonunun incelenmesi için immünohistokimyasal olarak NF-KB antikoru (Neomarkers, p65 (Rel A) Ab-1, transactivating subunit, 1/200 dilution, Fremont, Ca, USA) kullanılmıştır.

İmmunohistokimyasal prosedür için streptavidin-peroksidaz tekniği kullanıldı. Cam lamalar üzerindeki kesitler deparafinize edildikten sonra proteoliz için Sitrat Buffer (pH:6) solüsyonu içerisinde, 700 watt'lık devirde, 3X 5dk mikrodalgada ısıtma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda inkübe edildi. Fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkamayı takiben kesitler spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amacıyla serum ile 60 dk. muamele edildi. Daha sonra kesitlere 1/300 (NF-KB) primer antikorlar damlatılarak +4 OC'de 1 gece bekletildi. Kesitler biotinlenmiş sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi ve yıkamayı takiben streptavidin-HRP komplekste oda sıcaklığında 15dk. inkübe edildi. Son aşamada kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAP) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı.

NF-KB aktivasyonu mononükleer ve dev hücrelerdeki boyanma beraber değerlendirilerek tespit edildi. Tüm lamalar bağımsız bir gözlemci tarafından incelenerek, periferik dev hücreli granülomla lezyonlarında NF-KB antikorlarının boyanma şiddetine göre aşağıdaki skora yapıldı. Şiddetine göre; boyanma yok ise negatif, hafif şiddette boyanma var ise hafif şiddette, orta şiddette boyanma mevcut ise orta şiddette, şiddetli boyanma gözlemlenirse şiddetli boyanma olarak doku mikroarray kolları değerlendirildi. Her vaka için belirlenen boyanma şiddeti yüzde olarak hesaplanıp birbirleriyle karşılaştırıldı.

Olgu No.	Cinsiyet	Yaş	Lokalizasyon
1	K	20	Dişeti, sol alt 1. kesici diş bölgesi
2	K	67	Diş eti, sol üst çene 6 no'lu diş bölgesi
3	K	17	Diş eti, üst çene premolar bölge
4	K	48	Diş eti, üst çene ön bölge dişsiz kret
5	E	71	Çekim boşluğu, sağ alt çene 6 no'lu diş bölgesi
6	K	36	Diş eti, alt çene
7	E	21	Diş eti, üst çene
8	K	35	Diş eti, alt çene premolar diş bölgesi
9	E	21	Diş eti, üst çene kanin bölgesi
10	E	41	Diş eti, sol üst çene 2-3 no'lu diş bölgesi
11	E	47	Diş eti, alt çene molar bölge
12	K	17	Diş eti, üst çene premolar bölge
13	K	26	Diş eti, üst çene
14	E	21	Diş eti, alt çene ön dişsiz bölge
15	E	30	Çekim boşluğu, sol alt çene 6 no'lu diş bölgesi
16	K	74	Diş eti, alt çene
17	E	8	Diş eti, alt çene
18	E	70	Diş eti, alt çene
19	E	20	Diş eti, alt çene kesici bölge
20	E	72	Sert damak mukozası
21	E	7	Diş eti, sol üst çene süt molar bölge
22	K	52	Diş eti, alt çene molar bölge
23	E	46	Diş eti, üst çene
24	K	7	Diş eti üst çene
25	K	51	Diş eti, alt çene retromolar bölge
26	K	46	Diş eti, üst çene
27	E	25	Diş eti, sol üst çene kanin, premolar ve 6 no'lu diş bölgesi
28	E	21	Diş eti, sol alt çene
29	E	36	Diş eti, sol alt çene 6 no'lu diş bölgesi

Tablo 1: Klinik Bulgular

## BULGULAR

Vakalara ait klinik bilgiler Tablo I. 'de gösterilmiştir. Çalışmamızdaki en genç hasta 7, en yaşlı hasta ise 74 yaşındaydı ve vakaların ortalama yaşı 36.31 olarak bulundu.

Çenelerde lezyon yerleşimi incelendiğinde elde olan bilgiler ışığında, 15 vakanın alt çenede (%52) , 14 vakanın da üst çenede (% 48) lokalize olduğu saptandı. Çene içi lokalizasyon verisi mevcut olan hastalarda alt çenede görülen vakaların en çok molar bölgede (% 55,5) lokalize olduğu gözlemlendi . Üst çenede lokalize olan vakaların en çok görüldüğü bölgenin kesici-kanin bölgesi (% 40) olduğu belirlendi. Ayrıca dişli bölgelerden bağımsız olarak 1 vakanın sert damak mukozasında, diğer bir vakanın ise dişsiz kretta lokalizasyon gösterdiği belirlendi.

NF-KB immunohistokimyasal boyamasından sonra elde edilen histolojik bulgular Tablo II.'de gösterilmiştir.

Mononükleer ve dev hücreler NF-KB boyanması açısından incelendiğinde 19 vakada (% 65,5) şiddetli boyanma tespit edildi. 9 vakada (% 31) orta-şiddette boyanma gözlenirken 1 vakada (% 3,5) hafif şiddette boyanma gözlemlendi. Şiddetli ve orta şiddette boyanma gösteren vakalar bütün vakaların % 97'si olarak hesaplandı. NF-KB boyanması açısından negatif vakaya rastlanmadı. Orta şiddette ve hafif-şiddette boyanma gösteren vakaların hepsinde lezyonel özellik göstermeyen değişen derecelerde doku içine dağılmış kollajenize bağ doku adalarına rastlandı.

## TARTIŞMA

NF-KB lenfosit aktivasyonu, enflamasyon, hücre farklılaşması, hücre reseptörleri ve birçok sitokin ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu birçok gen de anlatım düzenlenmesi yapan, hücre apoptozisi ve hayatta kalımında rol oynayan çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür.<sup>10</sup>

NF-KB, TNF- $\alpha$ , IL-1, T-hücre aktivasyon sinyalleri , büyüme faktörleri ve stres uyarıcıları gibi birçok çeşit inflamatuvar sitokin ile uyarılarak dakikalar içinde aktive olabilmektedir. NF-KB hücre nükleusunda hedef DNA elementlerine bağlanarak immünoinflamatuvar cevap ve hücre büyüme kontrol ve apoptoziste rol oynayan genlerin transkripsiyonunu pozitif olarak kontrol eder.

NF-KB aktivasyonu ile uyarılan genlerin içinde IL-2, IL-6, IL-8, IL-2 reseptörü, IL-12 p40 alt ünitesi, VCAM-1, ICAM-1, TNF- $\alpha$ , IFN-, ve c-Myc'yi kodlayan genler de bulunmaktadır.<sup>4,5</sup> Böylece NF-KB'nın inflamatuvar cevapta büyük rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>11</sup>

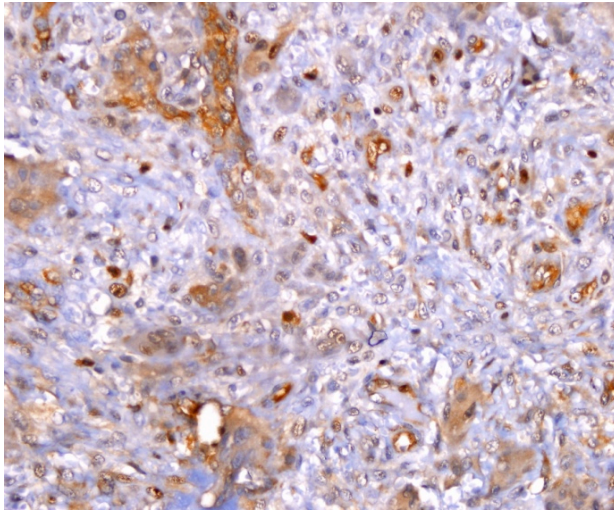
Olgu No.	NF-KB Boyanma Şiddeti
1	Şiddetli
2	Şiddetli
3	Orta-Şiddette
4	Orta Şiddette
5	Orta Şiddette
6	Orta Şiddette
7	Şiddetli
8	Şiddetli
9	Şiddetli
10	Şiddetli
11	Şiddetli
12	Şiddetli
13	Şiddetli
14	Şiddetli
15	Orta-Şiddette
16	Orta-Şiddette
17	Şiddetli
18	Şiddetli
19	Şiddetli
20	Şiddetli
21	Şiddetli
22	Şiddetli
23	Hafif-Şiddette
24	Orta-Şiddette
25	Orta-Şiddette
26	Şiddetli
27	Şiddetli
28	Orta-Şiddette
29	Şiddetli

Tablo 2: İmmunohistokimyasal Bulgular

Dev hücreli granüloma lokal irritasyonel etkiler veya travma nedeniyle oluşan reaktif, santral varyantının aksine çoğunlukla agresif davranış göstermeyen lezyonlardır. PDHG kökeni hakkında halen tartışmalar olsa da ortak görüş olarak son yıllarda lezyonun inflamatuvar kökenli bir patoloji olduğu kabul edilmiştir.<sup>12,13</sup>

Dev hücreli granüloma çok sayıda dev hücre içeren rezorptif bir lezyondur. Yapılan çalışmalarda dev hücrelerin kemik osteoklastlarıyla fenotip olarak çok benzer oldukları rapor edilmiştir.<sup>13,14</sup> Normal kemik metabolizmasında osteoklastların fonksiyonel hale geçmesi ve maturasyonu RANKL-RANK-OPG hücre dışı sinyal sistemiyle sağlanmaktadır.<sup>15</sup> Osteoblastlardan salgılanan bir molekül olan RANKL, osteoklast prekürsörleri üzerindeki RANK reseptörlerine bağlanarak hücre içi NF-KB sinyalizasyonunu aktive eder ve olgun osteoklastların oluşmasını ve böylece rezorpsiyonun başlamasını uyarır.<sup>16</sup> Dev hücreli granüloma da aynı mekanizmanın aktive olması olası görünmektedir.

Fanourakis ve arkadaşları periferel dev hücreli granulomalarda RANKL ve OPG aktivitesini araştırmışlar, örneklerde yoğun stromal RANKL aktivitesi OPG aktivitesi gözlemişlerdir. Bu durum periferel dev hücreli granüloma patogenezinin klasik osteoklastogenezis mekanizması ile ilişkisi olduğunu ve NF-KB hücre

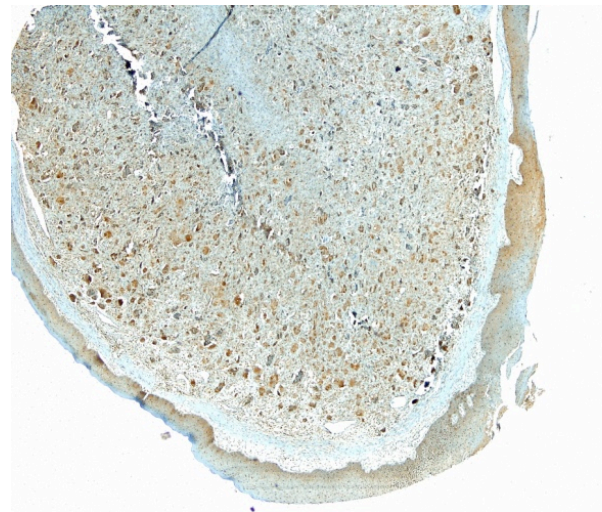


**Sekil 1:** Nükleer ve sitoplazmik boyanma gösteren stromal mononükleer ve osteoklast tipi dev hücreler. (NF-KB immünboyama x200)

içi sinyal yolağının hücre dışı elemanlarının PDHG patogenezinde rol oynadığını göstermektedir.<sup>17</sup> Literatürde PDHG'larda hücre içi NF-KB aktivasyonu bu çalışma dışında incelenmemiştir.

Çalışmamız için seçilen 29 vakanın 28'inde (%97) NF-KB boyanma yoğunluğu şiddetli ve orta-şiddetli olarak bulunmuştur. Çalışmamıza dahil ettiğimiz PDHG vakalarında NF-KB aktivasyon belirleyicisi olan p65 proteinin immunohistokimyasal yöntemle % 97 gibi bir oranla şiddetli ve orta şiddetli gibi yüksek yoğunluklarda tespit edilmesi ile NF-KB sinyal yolağının bu lezyonlarda aktif olduğu anlaşılmaktadır. Tüm vakalarda periferel dev hücreli granüloma özelliği göstermeyen bağ dokusu alanları gözlenmiştir. Bağ dokusu dağılımı ve yoğunluğu arttıkça NF-KB boyanma şiddeti azalmaktadır.

Periferel dev hücreli lezyonlarda hücre dışı NF-KB aktivasyonunu başlatıcı sinyal molekülleri başka çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>17</sup> Bu çalışma PDHG'larda hücre içi NF-KB aktivasyonunu göstermesi açısından literatürde tektir. NF-KB sinyal sistemine dışardan yapılacak bir moleküler müdahale sinyal sisteminin işleyişinin bozulmasına ve dolaylı olarak periferel dev hücreli lezyonun temel ögesi olan osteoklast tipi dev hücrelerin oluşumlarının sekteye uğramasına yol açabilir. Bu düşünceden hareketle NF-KB sinyal yolağını durduracak ilaçlar PDHG tedavisinde kullanılabilir.



**Sekil 2:** Periferel dev hücreli granülomada yüzeyde normal çok katlı yassı epitel, subepitelyal alanda ise lezyoner bölge görülmektedir. Lezyonel alanda kuvvetli boyanma mevcuttur. Epitel bazal tabakasında da hafif-şiddette boyanma göze çarpmaktadır. (NF-KB immünboyama x40)



## Kaynaklar

- 1- Jaffe, H.L. Giant cell reparative granuloma, traumatic bone cyst and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of jawbones. *J. Oral Surg.* 6: 159-175, 1953
- 2- Cawson R.A., Eveson J.W. *Oral Pathology and Diagnosis.* London: William Heinemann Medical Books, 1987
- 3- Nedir R, Lombardi T, Samson J. Recurrent peripheral giant cell granuloma associated with cervical resorption. *J. Periodontol.* 68:381-384, 1997
- 4- Ghosh S, May Mj, Kopp Eb. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225-260, 1998
- 5- Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell.* 47:921-928, 1986
- 6- Baldwin As Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14:649-683, 1996
- 7- Gupta Sc, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799:775-787, 2010
- 8- Katsikeris N, Kakarantza-Angelopoulou E, Angelopoulos AP. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 17:94-99, 1988
- 9- Günhan, Ö. *Oral ve Maksillofasiyal Patoloji.* 1. Baskı. Ankara: Atlas kitapçılık, 2001
- 10- Richmond A. NF-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol.* 2:664-674, 2002
- 11- Baldwin As Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest.* 107:3-6, 2001
- 12- Katsikeris N, Kakarantza-Angelopoulou E, Angelopoulos AP. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 17:94-99, 1988
- 13- Torabinia N, Razavi SM, Shokrolahi Z. A comparative immunohistochemical evaluation of CD68 and TRAP protein expression in central and peripheral giant cell granulomas of the jaws. *J. Oral Pathol. Med.* 40:334-337, 2011
- 14- Bonetti F., Pelosi G., Martignoni G., Mombello A., Zamboni G., Pea M., Scarpa A., Chilosi M. Peripheral giant cell granuloma: evidence for osteoclastic differentiation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 70:471-475, 1990
- 15- 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.* 89:309-319, 1997
- 16- Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1799:775-787, 2010
- 17- Fanourakis G, Krithinakis S, Tosios KI, Sklavounou A, Tseleni-Balafouta S. Expression of receptor activator of NF-B ligand and osteoprotegerin in peripheral giant cell granulomas of the jaws. *J. Oral Pathol. Med.* 39:687-689, 2010

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan GATA Patoloji Anabilimdalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Ömer Günhan'a sonsuz minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

## Yazışma Adresi:

Dr. Ömür Dereci  
Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Beşevler/Ankara  
E-posta: omurdereci@hotmail.com