

DARIUSZ CHRZEŚCZYK<sup>1, A, B, D-F</sup>, TOMASZ KONOPKA<sup>1, A-F</sup>, DAGMARA BACZYŃSKA<sup>2, C</sup>

## Wieloczynnikowe modele powstawania zapaleń przyzębia z uwzględnieniem wybranych czynników ryzyka

### Multifactorial Models of the Occurrence of Periodontitis with Regard to Selected Risk Factors

<sup>1</sup> Zakład Periodontologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, Polska

<sup>2</sup> Zakład Technik Molekularnych, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, Polska

A – koncepcja i projekt badania, B – gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – analiza i interpretacja danych, D – napisanie artykułu, E – krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Etiopatogeneza zapaleń przyzębia jako chorób społecznych jest wieloczynnikowa. Czynniki ryzyka najczęściej dzieli się na determinanty (czynniki niemodyfikowalne), którymi dla zapaleń przyzębia są: wiek, płeć, rasa i genotyp, oraz modyfikowalne czynniki ryzyka: zła higiena jamy ustnej i swoiste periopatogeny, nikotynizm, cukrzyca, otyłość, osteoporoza, status socjalno-ekonomiczny i stres.

**Cel pracy.** Przetestowanie wieloczynnikowych modeli występowania przewlekłego i agresywnego zapalenia przyzębia z uwzględnieniem wybranych czynników ryzyka: wieku, płci, genotypu (obciążenie rodzinne występowaniem zapalenia przyzębia i polimorfizmu Thr399Ile genu *TLR4*), higieny jamy ustnej, nikotynizmu oraz ekspresji mRNA *TLR2*, *TLR4* i *TLR9* w tkankach przyzębia.

**Materiał i metody.** Do badania zakwalifikowano 62 pacjentów w wieku 17–70 lat z przewlekłym (CP – 34 osoby) oraz agresywnym zapaleniem przyzębia (AgP – 28 osób). Grupę kontrolną stanowiło 30 ogólnie i periodontologicznie zdrowych ochotników w wieku 27–47 lat. Od wszystkich tych osób pobierano płyn dziąsłowy (dla oznaczenia polimorfizmu *TLR4*) oraz fragment dziąsła (w celu oceny ekspresji *TLR2*, *TLR4* i *TLR9*). W ocenie klinicznej stanu przyzębia uwzględniono: wskaźniki higieny jamy ustnej (PI i API), rozległości stanu zapalnego (BoP) oraz głębokości kieszonek i liczbę kieszonek przyzębnych powyżej 5 mm. Badanie poziomu ekspresji mRNA dla genów *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* przeprowadzono metodą względną PCR, mierzoną w czasie rzeczywistym z użyciem starterów i sond typu TaqMan znakowanych FAM. Wyniki normalizowano względem endogennej kontroli – genu *GAPDH*. Identyfikacja polimorfizmu Thr399Ile genu *TLR4* polegała na izolacji genomowego DNA z płynu dziąsłowego, a następnie genotypowaniu w reakcji PCR z udziałem swoistych starterów dla *TLR4*. Produkty PCR poddawano analizie restrykcyjnej z udziałem enzymu *HinfI*.

**Wyniki.** Wykazano częstsze występowanie obciążenia genetycznego w wywiadzie w agresywnym zapaleniu przyzębia. Występowanie nałogu nikotynowego nie różnicowało żadnej z ocenianych grup. Potwierdzono istotnie gorszy stan kliniczny przyzębia w obu grupach badanych w odniesieniu do kontrolnej.

**Wnioski.** Wieloczynnikowe modele oceny skorygowanego ryzyka pokazały ochronny wpływ ekspresji mRNA *TLR9* w tkankach przyzębia na wystąpienie przewlekłego zapalenia przyzębia oraz nasilające ryzyko działania obciążenia genetycznego ustalanego w wywiadzie lekarskim dla agresywnego zapalenia przyzębia (**Dent. Med. Probl.** 2014, 51, 3, 351–358).

**Słowa kluczowe:** polimorfizm, zapalenie przyzębia, TLR, czynnik ryzyka.

#### Abstract

**Background.** The etiology and pathogenesis of periodontitis is multifactorial. The risk factors are most commonly divided into determinants (modifiable factors). In case of periodontitis those are age, sex, race and genotype, and modifiable risk factors – poor oral hygiene and specific periopathogenes, smoking, diabetes, obesity, osteoporosis, socio-economic status and stress.

**Objectives.** To test multivariable models of the occurrence of chronic and aggressive periodontitis with regard to selected risk factors – age, sex, genotype (family history of periodontitis and gene *Thr399IleTLR4* polymorphism), oral hygiene, smoking status, and mRNA expression of *TLR2* and *TLR4*, *TLR9* in periodontal tissues.

**Material and Methods.** The study included 62 patients aged 17 to 70 years with chronic (CP – 34 individuals) and aggressive periodontitis (AgP – 28 individuals). The control group consisted of 30 general and periodontally healthy volunteers between the ages of 27 and 47 years. From all of these people gingival fluid (to identify *TLR4* polymorphism) and a fragment of the gingival tissue (to assess the expression of *TLR2*, *TLR4* and *TLR9*) were taken. The clinical evaluation of periodontal status included indicators of oral hygiene (PI and API), the extent of inflammation (Bop), pocket depth and the number of periodontal pockets greater than 5 mm. The determination of mRNA expression levels of genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* was performed by PCR relative measured in real time using primers and TaqMan probes labeled with FAM. The results were normalized with the endogenous control – GAPDH gene. The identification of Thr399Ile *TLR4* polymorphism consisted of isolation of genomic DNA and genotyped by PCR with specific primers. The PCR products were subjected to restriction analysis with the participation of the enzyme *Hinfl*.

**Results.** The study demonstrated higher incidence of genetic load acquired from medical history in AgP. The presence of nicotine addiction did not diversify any of the assessed groups. Significantly worse periodontal clinical status has been confirmed in both treatment groups with respect to controls.

**Conclusions.** The multivariate adjusted risk assessment models have shown a protective effect of *TLR9* mRNA expression in periodontal tissues on the occurrence of CP and increasing risk of incidence of AgP in patients with genetic load acquired from medical history (*Dent. Med. Probl.* 2014, 51, 3, 351–358).

**Key words:** TLR, periodontitis, polymorphism, risk factor.

Zapalenie przyzębia powstaje w następstwie niekontrolowanej lub nieadekwatnej odpowiedzi gospodarza na mikrobiota biofilmu poddziąsłowego. Niektóre czynniki mogą naruszać równowagę między periopatogenami a odpowiedzią gospodarza, zwiększając w ten sposób prawdopodobieństwo powstania zapalenia przyzębia. Czynnikiem ryzyka to indywidualna cecha osoby albo czynnik środowiskowy, który, jeśli jest obecny, zwiększa prawdopodobieństwo powstania choroby, a jeśli go nie ma, to takie prawdopodobieństwo się zmniejsza. Odpowiedź gospodarza wydaje się kluczowa dla ekspresji klinicznej zapalenia przyzębia. Szacuje się, że za 50% zmienności klinicznej periodontopatii odpowiada czynnik gospodarza, a zwłaszcza czynnik genetyczny, a tylko 20% zmienności zależy od mikrobiota [1]. Klasyczne czynniki ryzyka z reguły same nie wywołują zapalenia przyzębia, ale istotnie zwiększają możliwość jego powstania. Należy je różnicować z czynnikami wzmacniającymi, które nasilają przebieg periodontopatii oraz prognostycznymi, które zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia choroby w przyszłości.

Etiopatogeneza zapaleń przyzębia jako chorób społecznych jest wieloczynnikowa. Czynniki ryzyka najczęściej dzieli się na determinanty (czynniki niemodyfikowalne), którymi dla zapaleń przyzębia są wiek, płeć, rasa i genotyp, oraz modyfikowalne czynniki ryzyka – zła higiena jamy ustnej i swoiste periopatogeny, nikotynizm, cukrzyca, otyłość, osteoporoza, status socjalno-ekonomiczny i stres [1–4]. Znajomość modyfikowalnych czynników ryzyka pozwala na prowadzenie bardziej skutecznej profilaktyki pierwotnej i wtórnej zapaleń przyzębia.

Celem pracy było przetestowanie wieloczynnikowych modeli występowania przewlekłego i agresywnego zapalenia przyzębia z uwzględnieniem wybranych czynników ryzyka: wieku, płci,

genotypu (obciążenie rodzinne występowaniem zapalenia przyzębia i polimorfizmu Thr399Ile genu *TLR4*), higieny jamy ustnej, nikotynizmu oraz ekspresji mRNA *TLR2*, *TLR4* i *TLR9* w tkankach przyzębia.

## Material i metody

Do badania zakwalifikowano 62 pacjentów Zakładu Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w wieku 17–77 lat (średnia 48,0), w tym 33 kobiety. Wszyscy uczestnicy badania byli Polakami rasy kaukaskiej. Badanych dyskwalifikowano, jeśli nie posiadali przynajmniej 10 wydolnych czynnościowo zębów. Rozpoznanie zapalenia przyzębia było stawiane z uwzględnieniem definicji własnej, odpowiadającej średnio zaawansowanemu zapaleniu przyzębia wg Page i Eke [5] w odniesieniu do pomiaru głębokości kieszonek (PD), czyli występowanie przynajmniej dwóch zębów z kieszonkami powyżej 5 mm na powierzchniach międzystycznych.

Wyodrębniono dwie podgrupy: 34 osoby w wieku 39–70 lat (średnia 58,0), w tym 21 kobiet z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) oraz 28 osób w wieku 17–52 lat (średnia 35,25), w tym 12 kobiet z agresywnym zapaleniem przyzębia (AgP). Kryteriami do rozpoznania zarówno przewlekłego, jak i agresywnego zapalenia przyzębia były powszechnie akceptowane cechy kliniczne [6, 7].

Grupę kontrolną stanowiło 30 ogólnie zdrowych osób w wieku 27–47 lat (średnia 32, 13), w tym 13 kobiet zgłaszających się do Akademickiej Polikliniki Stomatologicznej we Wrocławiu. U tych osób była konieczna ekstrakcja zębów ze wskazań pozaperiodontologicznych. Wszyscy byli Polakami rasy kaukaskiej. Zastosowano następujące kryteria wykluczenia: choroby ogólnoustrojowe

we, mogące wpływać na stan przyzębia, antybiotykoterapia w czasie ostatnich 3 miesięcy, głębokość kieszonek powyżej 3 mm oraz wartość wskaźnika BoP > 10% (*Bleeding on Probing*). Wszyscy badani mieli przynajmniej 26 zębów.

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (numer zgody 392/2010).

Badanie przeprowadzono w okresie 1.06.2010 do 30.11.2012 r. w Zakładzie Periodontologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Po zakwalifikowaniu do grupy badanej lub kontrolnej i wyrażeniu zgody na udział w badaniu oceniano stan kliniczny przyzębia oraz przeprowadzano wywiad medyczny. W następnej kolejności w grupie badanej pobierano płyn dziąsłowy z najgłębszych klinicznie kieszonek. Zęby z tymi kieszonkami izolowano od dostępu śliny za pomocą bawełnianych wałków stomatologicznych, a następnie suszono sprężonym powietrzem. Używając sterylnych, jednorazowych pipet Pasteura z polipropylenu (1,0 ml) pobierano płyn dziąsłowy w objętości 0,1 ml, który potem uzupełniano do 1,0 ml buforowanym roztworem soli (PBS). Następnie w grupie badanej w znieczuleniu miejscowym artykainą z adrenaliną pobierano tkankę dziąsłową z okolicy najgłębszej kieszonki przyzębnej. Materiał zatapiano w całości w RNeasy Lysis Buffer (Sigma-Aldrich) – 5 objętości RNeasy Lysis Buffer na 1 objętość tkanki. Próbkę były przechowywane przez noc w temperaturze 2–8°C, a następnie zamrażane w temperaturze –20°C. W grupie kontrolnej fragmenty zdrowego klinicznie dziąsła pobierano podczas zabiegu ekstrakcji zęba z przyczyn niezwiązanych z patologią przyzębia. Materiał w postaci tkanki dziąsłowej oraz płynu dziąsłowego przekazywano następnie do Zakładu Techniki Molekularnych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Ekspresję mRNA genów *TLR2*, *TLR4* oraz *TLR9* oceniano w tkance dziąsłowej, natomiast do identyfikacji polimorfizmu Thr399Ile w zakresie genu kodującego receptor *TLR4* wykorzystywano płyn dziąsłowy.

Na podstawie wywiadu uzyskano informacje o 3 zmiennych: wieku, obciążeniu genetycznym zapaleniem przyzębia (pytano, czy rodzice lub rodzzeństwo traciło zęby z powodu rozchwiania i czy występowała u nich „parodontoza”) oraz nikotynizmu (kategoryzowano jako nigdy niepalący, były palacz – okres abstynencji ponad 5 lat i aktualny palacz – wypalany przynajmniej 1 papieros dziennie).

Badanie kliniczne prowadzono w oświetleniu sztucznym i wykorzystywano lusterko stomatologiczne oraz periodontometr wyskalowany co 1 mm. Oceniano 7 parametrów klinicznych:

– wskaźnik PI wg O’Leary et al. [8], oceniający w procentach występowanie płytki naddziąsłowej na powierzchniach przedsiónekowych i językowych zębów,

– wskaźnik API wg Lange et al. [9], oceniający w procentach występowanie płytki w przestrzeniach międzyzębowych,

– wskaźnik krwawienia podczas sondowania (BoP *Bleeding on Probing*) wg Ainamo i Baya [10], oceniający w procentach rozległość stanu zapalnego przyzębia poprzez stosunek miejsc krwawiących do zbadanych. Badanie przeprowadzono na 4 powierzchniach każdego zęba: bliższej, dalszej, językowej i policzkowej,

– PD1 – średnia głębokość kieszonek na powierzchniach międzystycznych wszystkich badanych zębów,

– PD2 – średnia głębokość kieszonek na 4 powierzchniach (międstycznych oraz policzkowej i językowej) wszystkich zębów badanych,

– PD3 – liczba kieszonek powyżej 5 mm,

– liczba zębów w jamie ustnej.

Badanie poziomu ekspresji mRNA dla genów *TLR2*, *TLR4*, *TLR9* przeprowadzono metodą PCR mierzoną w czasie rzeczywistym (*Real-time* – PCR) z użyciem starterów i sond typu TaqMan znakowanych FAM (*Applied Biosystems*). Wyniki normalizowano względem endogennej kontroli – genu *GAPDH*. Jako kalibrator użyto średnią z prób kontrolnych.

Genotypowanie Thr399Ile genu *TLR4* przeprowadzono reakcje PCR z udziałem specyficznych starterów dla *TLR4*. Produkty PCR poddawano analizie restrykcyjnej z udziałem enzymu *HinfI*. Enzym ten trawi sekwencje w obrębie miejsca polimorficznego, w przypadku sekwencji typu dzikiego enzym nie rozpoznaje miejsca cięcia i powstaje jeden produkt o długości 406 pz. W przypadku heterozygoty z allelem zmutowanym w wyniku trawienia enzymem powstają dwa fragmenty DNA o długości 406 (dziki typ) i 377 pz (zmutowany).

Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w trzech grupach przeprowadzono testem wariancji lub ANOVA rang Kruskala-Wallisa (w zależności od wyniku testu jednorodności wariancji Levene’a). Dla parametrów, dla których wykazano różnice istotnie statystyczne przy porównaniu 3 grup przeprowadzono test *post hoc* – analizę kontrastów testem Tukeya. Analizę wieloczynnikową przeprowadzono wykorzystując regresję logistyczną (estymacja metodą quasi-Newtona), obliczając iloraz szans (OR – *odds ratio*) i 95% przedział ufności dla niego (95% CI – *confidence interval*). Dla każdego testu uznawano za znaczące statystycznie  $p \leq 0,05$ .

## Wyniki

W tabelach 1–3 zestawiono wyniki dla grupy z przewlekłym i agresywnym zapaleniem przyzębia oraz kontrolnej dotyczące danych klinicznych oraz stężenia mRNA *TLR2*, *TLR4* i *TLR9*. U żadnej osoby z CP nie stwierdzono występowania polimorfizmu Thr399Ile *TLR4*. Zidentyfikowano go natomiast u 9 osób z AgP i 2 osób w grupie kontrolnej. W tabeli 4 pokazano ogólną i periodontologiczną charakterystykę badanych grup. Wykazano istotnie wyższy wiek w grupie z przewlekłym zapaleniem przyzębia oraz częstsze występowanie obciążenia genetycznego w wywiadzie w agresywnym

zapaleniu przyzębia. Występowanie nałogu nikotynowego nie różnicowało żadnej z ocenianych grup. Potwierdzono istotnie gorszy stan kliniczny przyzębia w obu grupach badanych w odniesieniu do kontrolnej.

W modelu regresji logistycznej po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, nikotynizmu i wskaźnika płytki PI wykazano istotny wpływ ekspresji mRNA *TLR9* w tkankach przyzębia na zmniejszenie ryzyka przewlekłego zapalenia przyzębia ( $OR_{AD} = 0,85$ , CI – 0,73 do 0,98,  $p = 0,031$ ) (tab. 5). Dla tego modelu występowała istotna różnica w odniesieniu do modelu tylko z wyrazem wolnym. W modelu regresji logistycznej po uwzględnieniu

**Tabela 1.** Charakterystyka zmiennych klinicznych i mRNA badanych *TLR* w przewlekłym zapaleniu przyzębia (CP)

**Table 1.** Characteristics of clinical variables and mRNA of examined *TLRs* in chronic periodontitis (CP)

Zmienna	Średnia	Odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana
Wiek	58,00	8,48	39,00	70,00	60,00
PI	58,32	24,37	19,00	100,00	52,50
API	77,74	27,57	10,00	100,00	97,50
BoP	46,13	23,17	6,00	100,00	45,40
PD1	3,91	0,56	2,64	5,30	3,75
PD2	3,11	0,42	2,30	4,09	3,01
PD3	11,35	5,54	2,00	27,00	10,50
Liczba zębów	20,03	4,70	11,00	28,00	20,50
Stężenie RNA	365,41	243,84	56,00	1103,00	302,50
<i>TLR2</i>	2,24	1,75	0,32	6,45	1,67
<i>TLR4</i>	13,74	19,03	0,02	85,93	4,98
<i>TLR9</i>	22,44	47,48	0,20	223,35	4,06
Stężenie DNA	20,69	20,32	1,30	120,20	18,60

**Tabela 2.** Charakterystyka zmiennych klinicznych i mRNA badanych *TLR* w agresywnym zapaleniu przyzębia (AgP)

**Table 2.** Characteristics of clinical variables and mRNA of examined *TLRs* in aggressive periodontitis (AgP)

Zmienna	Średnia	Odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana
Wiek	35,25	7,61	17,00	52,00	36,00
PI	29,63	20,77	6,00	86,00	27,00
API	61,14	24,85	21,00	100,00	57,50
BoP	43,30	27,32	0,00	100,00	41,50
PD1	4,32	0,95	3,30	7,08	4,08
PD2	3,40	0,67	2,63	5,50	3,29
PD3	21,11	12,43	5,00	57,00	21,00
Liczba zębów	25,18	3,31	14,00	28,00	26,00
Stężenie RNA	376,25	441,44	46,00	1824,00	221,50
<i>TLR2</i>	1,81	1,55	0,21	7,42	1,44
<i>TLR4</i>	16,66	27,90	0,25	133,89	5,36
<i>TLR9</i>	6,36	7,41	0,00	28,10	3,68
Stężenie DNA	24,19	14,20	3,80	69,40	23,95

**Tabela 3.** Charakterystyka zmiennych klinicznych i mRNA badanych *TLR* w grupie kontrolnej**Table 3.** Characteristics of clinical variables and mRNA of examined *TLRs* in the control group

Zmienna	Średnia	Odchylenie standardowe	Wartość minimalna	Wartość maksymalna	Mediana
Wiek	32,13	4,17	27,00	47,00	31,00
PI	17,81	10,50	3,50	42,30	14,30
API	24,32	12,76	3,50	53,60	21,40
BoP	7,32	6,29	0,00	24,00	5,40
PD1	2,32	0,23	1,70	2,70	2,29
PD2	2,00	0,17	1,50	2,20	2,05
PD3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Liczba zębów	27,43	0,82	26,00	28,00	28,00
Stężenie RNA	208,50	189,52	30,00	878,00	164,00
<i>TLR2</i>	1,61	1,68	0,29	7,37	0,94
<i>TLR4</i>	5,71	14,13	0,00	72,56	1,86
<i>TLR9</i>	2,12	3,75	0,00	16,70	0,88
Stężenie DNA	10,52	6,99	1,20	26,90	8,05

**Tabela 4.** Porównanie zmiennych klinicznych oraz występowania czynników ryzyka między grupami badanymi a kontrolną**Table 4.** Comparison of clinical variables and occurrence of risk factors between the study groups and the control

Zmienna	Przewlekłe zapalenie przyzębia (n = 34)	Agresywne zapalenie przyzębia (n = 28)	Grupa kontrolna (n = 30)	p
Wiek	58,0 ± 8,48	35,25 ± 7,61	32,13 ± 4,17	< 0,000
Płeć – M/K	13/21	16/12	17/13	n.s.
Liczba nikotynistów	8	2	2	n.s.
Liczba osób z obciążeniem gen. w wywiadzie	7	20	7	0,001
Średnia wartość PI	58,32 ± 24,37	29,62 ± 20,77	17,8 ± 10,7	< 0,000
Średnia wartość API	77,74 ± 27,56	61,14 ± 24,9	24,32 ± 12,76	< 0,000
Średnia wartość BoP	46,13 ± 23,16	43,3 ± 27,32	7,32 ± 6,28	< 0,000
Średnia wartość PD1	3,9 ± 0,56	4,32 ± 0,95	2,32 ± 0,23	< 0,000
Średnia wartość PD2	3,11 ± 0,42	3,4 ± 0,67	2,0 ± 0,17	< 0,000
Mediana PD3	10,5	21	0	< 0,000
Mediana liczby zębów	20,5	26	28	< 0,000

wpływu wieku, płci, nikotynizmu, wskaźnika płytki API oraz występowania Thr399Ile *TLR4* stwierdzono z kolei istotny wpływ obciążenia genetycznego ustalanego w wywiadzie na zwiększenie ryzyka agresywnego zapalenia przyzębia (OR<sub>AD</sub> = 5,91, CI – 1,83 do 19,08, p = 0,0036) (tab. 6).

## Omówienie

W chorobach kompleksowych, jakimi są zapalenia przyzębia oprócz interakcji wielu genów z biofilmem periopatogenów w kieszonkach przyzębnych jest też ważny wpływ innych usankcjonowanych czynników ryzyka periodontopatii (wie-

ku, płci, rasy, nikotynizmu, wybranych chorób ogólnych, stresu i statusu socjalno-ekonomicznego), które mogą być czynnikami zakłócającymi wielu badań. Dla przykładu aktywny nikotynizm jest uznanym czynnikiem zmieniającym szlaki sygnałowe w odpowiedzi immunologiczno-zapalnej oraz modyfikującym oddziaływanie polimorfizmów genowych. Dlatego tak ważne jest jednoczesne uwzględnianie wpływu wielu zmiennych niezależnych na występowanie lub przebieg kliniczny zapalenia przyzębia. Niezwykle przydatnym narzędziem analitycznym dla takich modeli wieloczynnikowych jest regresja logistyczna, dlatego w badaniach własnych zaproponowano modele powstawania przewlekłego i agresywnego zapalenia

**Tabela 5.** Wynik regresji logistycznej dla związku ekspresji *TLR9* w tkankach przyzębia z ryzykiem wystąpienia przewlekłego zapalenia przyzębia z uwzględnieniem korekcji o wiek, płeć, nikotynizm i wskaźnik płytki PI (wartość  $\chi^2$  modelu – 14,33,  $p = 0,0001$ )

**Table 5.** Result of logistic regression for association of *TLR9* expression in periodontal tissues with risk of development of chronic periodontitis taking into account age, sex, smoking status and plaque index PI ( $\chi^2$  value – 14.33,  $p = 0.0001$ )

Zmienna niezależna i wyraz wolny	Skorygowany iloraz szans (OR)	95% przedział ufności	p i 95% przedział ufności
Ekspresja <i>TLR9</i>	0,85	0,73–0,98	$p = 0,031$ (–0,31 do –0,01)
Wyraz wolny B0	1,82	0,91–3,67	$p = 0,08$ (–0,09 do 1,3)

**Tabela 6.** Wynik regresji logistycznej dla związku obciążenia genetycznego w wywiadzie z ryzykiem wystąpienia agresywnego zapalenia przyzębia z uwzględnieniem korekcji o wiek, płeć, nikotynizm i wskaźnik płytki API (wartość  $\chi^2$  modelu – 10,2,  $p = 0,0014$ )

**Table 6.** Result of logistic regression for association of genetic load acquired from medical history with risk of development of aggressive periodontitis taking into account age, sex, smoking status and plaque index API ( $\chi^2$  value – 10.2,  $p = 0.0014$ )

Zmienna niezależna i wyraz wolny	Skorygowany iloraz szans (OR)	95% przedział ufności	p i 95% przedział ufności
Obciążenie genetyczne w wywiadzie	5,91	1,83–19,08	$p = 0,003$ (0,6 do 2,95)
Wyraz wolny B0	0,39	0,15–0,94	$p = 0,038$ (–1,8 do –0,05)

przyzębia pod wpływem ekspresji *TLR* i polimorficznego genotypu *TLR4* z uwzględnieniem potencjalnych czynników zakłócających. Dużym ograniczeniem tych modeli jest mała liczebność prób.

W badaniu własnym wykazano, że po uwzględnieniu wieku, płci, statusu nikotynowego i płytki nazębnej ryzyko występowania przewlekłego zapalenia przyzębia było istotnie związane z ekspresją mRNA *TLR9* w tkankach przyzębia i było to działanie ochronne. W modelu nie uwzględniono wpływu Thr399Ile *TLR4* z powodu niewystępowania tego genotypu u badanych pacjentów z CP. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono tylko kilka regresji logistycznych uwzględniających wpływ polimorfizmów *TLR2*, *TLR4* i *TLR9* oraz uznanych czynników ryzyka na powstawanie przewlekłego zapalenia przyzębia [11–14]. W najbardziej zbliżonym modelu Berdeli et al. [11] nie wykazali istotnego wpływu genotypów Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gly *TLR4* i Thr399Ile *TLR4* na występowanie CP u Turków, przy potwierdzeniu silnego związku z nikotynizmem i wzrastającym wiekiem oraz słabszego, ale również istotnego z płcią męską. U Amerykanów po skorygowaniu o wiek, rasę i palenie tytoniu pokazano istotny wpływ polimorfizmu CD14 (C260T) na zwiększenie ryzyka CP i przeciwny, chociaż nieistotny statystycznie, związek z polimorfizmem *TLR9* (T1486C) (OR = 0,48, CI – 0,2 do 2,08) [12]. Znane są dwa sprzeczne badania dotyczące wykorzystania regresji logistycznej do oceny wpływu polimorficznych genotypów *TLR4* na zaawansowanie przewlekłego zapalenia przyzębia. Noack et al. [13] po uwzględnieniu

wpływu wieku, płci i nikotynizmu zaobserwowali wpływ genotypów Asp299Gly *TLR4* i Thr399Ile *TLR4* na zaawansowanie CP u Niemców, a fińskie badania dotyczące wyłącznie Asp299Gly *TLR4* tego nie potwierdziły [14]. Badania własne jako pierwsze wskazują zatem na ochronne działanie wzrostu ekspresji *TLR9* dla powstawania przewlekłego zapalenia przyzębia. Być może zwiększenie ekspresji *TLR9* w CP jest nie tylko wyrazem ekspozycji na periopatogeny, ale i wirusy z rodziny *Herpesviridae*, o których znaczeniu dla przebiegu tej periodontopatii wiadomo od dawna [15].

Chociaż ostatnio wiele dyskutuje się o braku różnic między ciężkim uogólnionym przewlekłym zapaleniem przyzębia a uogólnionym agresywnym zapaleniem przyzębia, szczególnie po 35. roku życia, to jednak inny dynamizm przebiegu klinicznego i brak prostego związku w pierwszej fazie z występowaniem płytki nazębnej wskazują, że sekwencja interakcji między periopatogenami a szeroko rozumianym czynnikiem gospodarza podczas powstawania i progresji obu chorób jest inna. Przykładowo występują znaczące różnice między AgP a CP w ekspresji genów i stężeniach  $\beta$ -defensyn, a także inne może być działanie limfocytów Th1 i Th2 w tych zapaleniach [16]. W zlokalizowanej postaci agresywnego zapalenia przyzębia wykazano, że podczas stymulacji *TLR4* LPS pochodzącym od *P. gingivalis* obwodowe leukocyty wydzielają istotnie więcej cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8) w odniesieniu do kontroli [17]. Może to wskazywać na obecność fenotypu nadreaktywnych limfocytów w tej periodontopatii. Z kolei u osób rasy kaukaskiej istnieją do-

wody z metaanaliz na istotne zwiększenie ryzyka wystąpienia CP u nosicieli polimorficznych alleli IL-1A (-889) i IL-1B (+3954) oraz niezależnie IL-10 (-592) [18]. Dla zapaleń agresywnych takich dowodów nie ma, dlatego w badaniach własnych w założeniach wyjściowych dla modelu regresji logistycznej w AgP uwzględniono inne zmienne (obciążenie genetyczne w wywiadzie, polimorficzny genotyp *TLR4*, ekspresja *TLR4*). Po uwzględnieniu wpływu wieku, płci, nikotynizmu, występowania płytki w przestrzeniach międzyzębowych okazało się, że najsilniejszy związek ze zwiększeniem prawdopodobieństwa (wzrost prawie sześciokrotny) ryzyka agresywnego zapalenia przyzębia miało obciążenie genetyczne w wywiadzie. Nie potwierdzono natomiast znaczącego wpływu polimorficznego genotypu *TLR4*. Model ten był słabszy niż dla CP (niższa wartość  $Ch^2$ , brak istotnej różnicy dla istotnej zmiennej niezależnej w odniesieniu do wyrazu wolnego) i jedynie potwierdził ogólnie znaną prawidłowość, która ciągle nie znajduje wyjaśnienia molekularnego. Należy zauważyć ogólnikowość stwierdzenia o rodzinnym charakterze „wczesnej ruchomości i szybkiej utracie zębów” i subiekty-

wizm w pozyskiwaniu wiedzy z wywiadu lekarskiego. Emingil et al. [19] również zaprezentowali model regresji logistycznej dla zmian ryzyka występowania uogólnionego agresywnego zapalenia przyzębia i nie potwierdzili wpływów genotypów Arg753Gln *TLR2*, Asp299Gly *TLR4* i Thr399Ile *TLR4* u Turków w wieku 16–39 lat. Zauważyli natomiast ochronny wpływ wieku oraz nikotynizmu (wzrost ryzyka ponad ośmiokrotny). Noack et al. [20] po uwzględnieniu płci i statusu nikotynowego nie zaobserwowali natomiast zmian ryzyka przebiegu klinicznego uogólnionego agresywnego zapalenia przyzębia w powiązaniu z nosicielstwem Asp299Gly *TLR4* i Thr399Ile *TLR4* oraz dwóch polimorficznych genotypów IL-18 w grupie Niemców poniżej 40. roku życia. Wszystkie te badania są zgodne z własnymi co do braku większego wpływu genotypów polimorficznych *TLR4* na podatność dotyczącą powstawania i przebiegu klinicznego agresywnego zapalenia przyzębia. Wydaje się, że badanie kompleksów pojedynczych nukleotydów genów związanych z odpowiedzią immunologiczno-zapalną w najcięższych zapaleniach przyzębia przyniosą nowe rozstrzygnięcia dotyczące ich genetycznej podatności.

## Piśmiennictwo

- [1] POSITION I.: Epidemiology of periodontal diseases. *J. Periodontol.* 2005, 76, 1406–1419.
- [2] GENCO R.J.: Current view of risk factors for periodontal diseases. *J. Periodontol.* 1996, 67, 1041–1049.
- [3] BORRELL L.N., PAPAPANOU P.N.: Analytical epidemiology of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2005, 32, 132–158.
- [4] JIN L.J., ARMITAGE G.C., KLINGE B., LANG N.P., TONETTI M., WILLIAMS R.C.: Global oral health inequalities: task group – periodontal disease. *Adv. Dent. Res.* 2011, 23, 221–226.
- [5] EKE P.I., PAGE R.C., WEI L., THORNTON-EVANS G., GENCO R.J.: Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J. Periodontol.* 2012, 83, 1449–1454.
- [6] LINDHE J., RANNEY R., LAMSTER I., CHARLES A., CHONG-PYOUNG C., FLEMMING T., KINANE D., LISTGARTEN M., LOE H., SCHOOR R., SEYMOUR G., SOMERMAN M.: Consensus report: chronic periodontitis. *Ann. Periodontol.* 1999, 4, 38.
- [7] LANG N., BARTOLD M.P., CULLINAN M., JEFFCOAT M., MOMBELLI A., MURAKAMI S., PAGE R., PAPAPANOU P., TONETTI M., VAN DYKE T.: Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann. Periodontol.* 1999, 4, 53.
- [8] O'LEARY T.J., DRAKE R.B., NAYLOR J.E.: The plaque control record. *J. Periodontol.* 1972, 43, 38.
- [9] LANGE D.E., PLEGMANN H.C., EENBOOM A., PROMSBERGER A.: Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 1977, 32, 44–47.
- [10] AINAMO J., BAY I.: Problems and proposal for recording gingivitis and plaque. *Int. Dent. J.* 1975, 25, 229–235.
- [11] BERDELI A., EMINGIL G., SAYGAN B.H., GÜRKAN A., ATILLA G., KÖSE T., BAYLAS H.: *TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly* and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J. Clin. Periodontol.* 2007, 34, 551–557.
- [12] SAHINGUR S.E., XIA X.J., GUNSOLLEY J., SCHENKEIN H.A., GENCO R.J., DE NARDIN E.: Single nucleotide polymorphisms of pattern recognition receptors and chronic periodontitis. *J. Periodont. Res.* 2011, 46, 184–192.
- [13] NOACK B., GÖRGENS H., LORENZ K., SCHACKERT H.K., HOFFMANN T.: *TLR4* and IL-18 gene variants in chronic periodontitis: impact on disease susceptibility and severity. *Immunol. Invest.* 2009, 38, 297–310.
- [14] TERVONEN T., RAUNIO T., KNUUTTILA M., KARTTUNEN R.: Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 2007, 34, 377–383.
- [15] CONTRERAS A., SLOTS J.: Herpesviruses in human periodontal disease. *J. Periodontal. Res.* 2000, 35, 3–16.
- [16] FORD P.J., GAMONAL J., SEYMOUR G.J.: Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol.* 2000, 2010, 53, 111–123.
- [17] SHADDOX L., WIEDEY J., BIMSTEIN E., MAGNUSON I., CLARE-SALZLER M., AUKHIL I., WALLET S.M.: Hyper-responsive phenotype in localized aggressive periodontitis. *J. Dent. Res.* 2010, 89, 143–148.
- [18] LAINE M.L., CRIELAARD W., LOOS B.G.: Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol.* 2000, 2012, 58, 37–68.
- [19] EMINGIL G., BERDELI A., BAYLAS H., SAYGAN B.H., GÜRKAN A., KÖSE T., ATILLA G.: Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms in generalized aggressive periodontitis. *J. Periodontol.* 2007, 78, 1968–1977.
- [20] NOACK B., GÖRGENS H., LORENZ K., ZIEGLER A., HOFFMANN T., SCHACKERT H.K.: *TLR4* and IL-18 gene variants in aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2008, 35, 1020–1026.

**Adres do korespondencji:**

Dariusz Chrzęszczyk  
Katedra i Zakład Periodontologii UMW  
Krakowska 26  
50-425 Wrocław  
Polska  
e-mail: darek.chrzesczyk@interia.eu

Konflikt interesów: nie występuje

Praca wpłynęła do Redakcji: 3.05.2014 r.  
Po recenzji: 12.05.2014 r.  
Zaakceptowano do druku: 23.05.2014 r.

Received: 3.05.2014  
Revised: 12.05.2014  
Accepted: 23.05.2014