

Messenger RNA Expression of Toll-Like Receptors 2, 4 and 9 in periodontitis

Ekspresja mRNA receptorów Toll-podobnych 2, 4 i 9 w zapaleniu przyzębia

Dariusz Chrzęszczyk¹, Dagmara Baczyńska², Tomasz Konopka¹

¹ Katedra Periodontologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska
Department of Periodontology, Wrocław Medical University, Poland
Head: prof. M. Ziętek

² Katedra Medycyny Sądowej, Zakład Technik Molekularnych, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Polska
Department of Forensic Medicine, Molecular Techniques Unit, Wrocław Medical University, Poland.
Head: prof. T. Dobosz

Abstract

Introduction. Many studies focus on significant differences in the expression of TLRs in periodontitis and healthy controls. The biological function of TLRs must have its toll on the host response to opportunistic bacteria present in the oral cavity and in the gingival sulcus/periodontal pocket. **Aim of the study.** To assess TLR2, TLR4 and TLR9 expression in periodontal tissues in patients with chronic and aggressive periodontitis. Also to compare studied TLRs' expression with clinical parameters of periodontitis and evaluate clinical periodontal status among patients with very low and very high expression of examined TLRs. **Material and methods.** The study included 62 patients aged from 17 to 70 years with chronic (CP-34) and aggressive periodontitis (AgP-28) and 30 healthy controls. From all participants a fragment of the gingival tissue was taken to assess the expression of mRNA TLRs. **Results.** All patients had significantly higher expression of TLR4 and TLR9 compared to control. TLR9 expression was significantly higher in the CP with regard to AgP. There was no significant correlation between the expression of TLRs and clinical variables in all subjects with CP. Patients with AgP exhibited positive correlations between the expression of all TLRs and the presence of plaque. This group also showed positive correlations between the expression of TLR4 and

Streszczenie

Wstęp. W wielu pracach zwracano uwagę na statystycznie istotne różnice w ekspresji receptorów TLR pomiędzy pacjentami z zapaleniem przyzębia a zdrowymi osobnikami. Wynika z tego, że biologiczna funkcja tych receptorów może mieć wpływ na odpowiedź gospodarza na oportunistyczne bakterie obecne w jamie ustnej i szczelinie/kieszonce dziąsłowej. **Cel pracy.** Celem pracy była ocena ekspresji receptorów TLR2, TLR4 i TLR9 w tkance dziąsłowej u pacjentów z agresywnym i przewlekłym zapaleniem przyzębia, porównanie poziomów ekspresji tych receptorów z klinicznymi wskaźnikami choroby oraz ocena statusu klinicznego u pacjentów z bardzo wysokimi i bardzo niskimi poziomami ekspresji badanych receptorów. **Material i metody.** Do badania włączono 62 pacjentów w wieku od 17 do 70 lat, w tym 34 z przewlekłym (CP) i 28 z agresywnym (AgP) zapaleniem przyzębia. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych osobników. Od wszystkich badanych pozyskano fragment tkanki dziąsłowej w celu oceny poziomów ekspresji badanych receptorów. **Wyniki.** U wszystkich pacjentów z zapaleniem przyzębia stwierdzono wyższą ekspresję TLR4 i TLR9 w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja TLR9 była znacząco wyższa w CP w porównaniu z AgP. Nie stwierdzono żadnych znaczących korelacji pomiędzy

KEYWORDS:

periodontal disease, toll-like receptors (TLRs), periodontal risk factor

HASŁA INDEKSOWE:

zapalenia przyzębia, receptory Toll-podobne (TLRs), czynniki ryzyka periodontitis

TLR9 and the severity of periodontitis. Substantially higher values of all periodontal indices and a lower number of teeth were reported in 15 individuals with the highest expressions of TLR4. 15 patients with the highest expressions of TLR9 showed significantly higher rates only for plaque, severity and extent of inflammation indices. **Conclusions.** Regardless of the clinical diagnosis high TLR4 mRNA expression in the gingival tissue is associated with the severity, generalization and progression of periodontitis. High TLR9 expression is associated mainly with plaque, and could fulfill the protective function against progression of periodontitis.

Introduction

Periodontitis is an infectious disease characterized by inflammation and progressive periodontal tissues destruction. It is initiated by the loss of balance between the Gram-negative periopathogens from bacterial biofilm and host response, which depends on genetic and epigenetic factors. One component of this balance is identification of periopathogens – the so-called Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) by toll-like receptors family (TLR) conservative in their structure elements. This leads to the nuclear factor NF- κ B transcription and consequently to expression of genes encoding pro-inflammatory mediators.¹⁻³ The main function of these receptors is associated with innate or acquired immune response and autoimmune processes. Currently, 11 types of toll-like receptors have been identified in humans. They are expressed by cells of the immune system: neutrophils (all except TLR3), macrophages (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8), dendritic cells (TLR1-TLR10), B cells (TLR1, TLR3, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10), Th cells (TLR2, TLR3, TLR5, TLR9) and regulatory T cells (TLR2, TLR5, TLR8).^{3,4} Almost all existing human TLRs (1

ekspresją badanych TLR a zmiennymi klinicznymi w grupie CP. U pacjentów z agresywnym zapaleniem przyzębia wykazano pozytywną korelację pomiędzy poziomami ekspresji wszystkich badanych TLR a obecnością płytki nazębnej. W grupie tej stwierdzono również pozytywny związek pomiędzy ekspresją TLR4 i TLR9 a zaawansowaniem choroby. Znacząco wyższe wartości wskaźników periodontologicznych i mniejszą liczbę zębów odnotowano w grupie 15 osób z najwyższą ekspresją TLR4. U 15 pacjentów z najwyższą ekspresją TLR9 stwierdzono jedynie zwiększone wartości wskaźników płytki nazębnej oraz ciężkości i rozległości stanu zapalnego. **Wnioski.** Bez względu na rozpoznanie kliniczne wysokie wartości ekspresji mRNA TLR4 w tkance dziąsłowej są powiązane z ciężkością, rozległością i progresją zapalenia przyzębia. Z drugiej strony wysokie wartości ekspresji mRNA TLR9 koreluje głównie z obecnością płytki nazębnej i mogą pełnić rolę ochronną przed progresją periodontitis.

Wstęp

Zapalenie przyzębia jest wieloczynnikową chorobą społeczną charakteryzującą się stanem zapalnym i postępującą destrukcją tkanek aparatu zawieszeniowego zębów. Jest ono zapoczątkowane w następstwie utraty równowagi pomiędzy Gram-ujemnymi periopatogenami biofilmu bakteryjnego a odpowiedzią gospodarza, która zależy od czynników genetycznych i epigenetycznych. Jednym z elementów tej równowagi jest rozpoznawanie konserwatywnych w budowie składników ścian periopatogenów, tzw. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) przez rodzinę toll like receptors (TLR), których aktywacja prowadzi do uaktywnienia transkrypcji czynnika NF- κ B i ekspresji genów kodujących mediatory prozapalne.¹⁻³ Główna funkcja tych receptorów związana jest z wrodzoną lub nabytą odpowiedzią immunologiczną oraz procesami autoimmunizacyjnymi. Obecnie znanych jest 11 rodzajów tych receptorów u ludzi. Występują one na komórkach układu immunologicznego: neutrofilach (wszystkie poza TLR3), makrofagach (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8), komórkach dendrytycznych (TLR1-TLR10), limfocytach B (TLR1, TLR3, TLR6, TLR7, TLR9 i TLR10), limfocytach

to 9) have been identified in both healthy and inflamed periodontal tissues.⁵ In clinically healthy periodontium, gingival epithelial cells of the superficial layer exhibited the highest expression of TLR1, TLR2, TLR7, TLR8 and TLR5 and the lowest expression of TLR9. In the spinous layer the greatest expression of TLR1, TLR7 and TLR8 and the lowest of TLR9 was determined. The basal layer was characterized by the highest expression of TLR1, TLR8, TLR7, TLR3 and again the lowest expression of TLR9.⁵ Expression of TLR in the connective tissue of clinically healthy gingiva was associated mainly with fibroblasts and macrophages, and the highest percentage of TLR-positive cells was TLR2 (connective tissue directly adjacent to junctional epithelium), TLR4 (between junctional epithelium and epithelium of the oral cavity), TLR5 and TLR6. Expression of TLR9 was by far the lowest of them all.^{5,6} In periodontal tissues, apart from oral epithelium, connective tissue and junctional epithelium expression of TLR was described for endothelial cells (TLR1, TLR4), periodontal fibroblasts (TLR2, TLR4), osteoblasts (TLR4, TLR5, TLR9), osteoclasts (TLR2, TLR4) and cementoblasts (TLR2, TLR4).³ Immunohistochemical studies of gingival tissue in chronic periodontitis (CP) showed a significantly higher expression of all nine Toll-like receptors relative to clinically healthy gingiva.⁵ In the spinous and granular layers of gingival epithelium in the course of periodontitis particularly characteristic is a great number of cells positive for TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR7, and TLR8. An increase of these expressions concerns structural periodontal cells (keratinocytes and fibroblasts), and in connective tissue it is associated with progressive mononuclear cell infiltration. In the course of chronic periodontitis higher expression of TLR2 was observed on epithelial cells and subepithelial connective tissue of gingiva in relation to healthy gingiva (58.4% vs. 20.5% and 52.9% vs. 16.2%, respectively).⁷ Other immunohistochemical studies showed no TLR9 positive cells in gingival epithelium (junctional and oral) for gingivitis. Their rapid expression appeared in periodontitis predominantly in the basal layer of the oral epithelium, in all layers

Th (TLR2, TLR3, TLR5, TLR9) i limfocytach T regulatorowych (TLR2, TLR5, TLR8).^{3,4} W zdrowych i zmienionych zapalnie tkankach przyzębia w badaniach immunohistochemicznych opisano ekspresję prawie wszystkich występujących u człowieka TLR (od 1 do 9).⁵ W zdrowym klinicznie przyzębiu komórki nabłonka dziąsłowego w warstwie powierzchniowej wykazywały najwyższą ekspresję TLR1, TLR2, TLR7, TLR5 i TLR8 a najniższą TLR9, w warstwie kolczystej stwierdzono największą ekspresję TLR1, TLR7 i TLR8, natomiast najmniejszą dla TLR9, z kolei w warstwie podstawnej największa ekspresja dotyczyła TLR1, TLR8, TLR7 i TLR3, a najmniejsza znowu TLR9.⁵ Ekspresja TLR w tkance łącznej klinicznie zdrowego dziąsła związana była głównie z fibroblastami i makrofagami, a najwyższy odsetek TLR pozytywnych komórek to TLR2 (w tkance łącznej sąsiadującej bezpośrednio z przyczepem nabłonkowym), TLR4 (w części pośrodkowej między przyczepem nabłonkowym a nabłonkiem jamy ustnej) oraz TLR5 i TLR6, a zdecydowanie najniższy to TLR9.^{5,6} W tkankach przyzębia oprócz nabłonka jamy ustnej i łączącego oraz tkanki łącznej dziąsła ekspresję TLR opisano dla komórek śródbłonka (TLR1, TLR4), fibroblastów ożębnej (TLR2 i TLR4), osteoblastów (TLR4, TLR5 i TLR9), osteoklastów (TLR2 i TLR4) oraz cementoblastów (TLR2 i TLR4).³ W badaniach immunohistochemicznych tkanki łącznej dziąsła w przewlekłym zapaleniu przyzębia (CP) pokazano istotnie wyższą ekspresję wszystkich 9 receptorów Toll-podobnych w odniesieniu do klinicznie zdrowego dziąsła.⁵ W warstwach kolczystej i ziarnistej nabłonka dziąsłowego w przebiegu *periodontitis* charakterystyczna jest szczególnie wysoka liczba komórek dodatnich dla TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR7 i TLR8. Wzrost tych ekspresji dotyczy komórek strukturalnych przyzębia (keratynocytów i fibroblastów), a w tkance łącznej jest związany z powiększającym się naciekiem komórek jednojądrzastych. W CP zaobserwowano wyższą ekspresję TLR2 na komórkach nabłonka i podnabłonkowej tkance łącznej dziąsła w odniesieniu do dziąsła zdrowego (odpowiednio 58,4% vs 20,5% i 52,9% vs 16,2%).⁷ W innych badaniach immunohistochemicznych nie wykazywano

of junctional epithelium and in particular in subepithelial connective tissue.⁸

Particularly interesting, in the context of the etiopathogenesis of periodontitis, are TLR2, TLR4 and TLR9 for they recognize bacterial and viral PAMPs derived from periopathogens. TLR2 and TLR4 are present in the cell membrane of resident and non-resident cells of the periodontium. TLR2 recognizes, among others, PAMPs such as lipoproteins, peptidoglycans, lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria, zymosan from fungi, LPS and fimbriae from *Porphyromonas gingivalis*, LPS from *Capnocytophaga ochracea*, sonicates (*Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*), proteins from Cytomegalovirus, HSV-1 and HSV-2 and host protein HSP70.^{3,9-11} The main ligand for TLR4 is bacterial lipopolysaccharide (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*).^{3,11,12} Other TLR4 ligands include taxol (antitumor substance isolated from the bark of yew), mannan (*Candida sp.*), fibrinogen, polysaccharide fragments of heparan sulfate, fibronectin, oligosaccharides of hyaluronic acid, endogenous HSP60 and 70.^{3,13} In turn, the main PAMPs for TLR9 (contained within endosomes) are viral (HSV) and the bacterial double-stranded DNA containing unmethylated and hypomethylated sequences cytosine-phosphate-guanosine.⁹ Attempts to modify the TLR receptors activity using the synthetic agonists or antagonists are designed to discover new drugs that may be used in the treatment of chronic infections.

The aim of the study was to evaluate and compare the mRNA expressions of TLR2, TLR4 and TLR9 in periodontal tissues in patients with chronic and aggressive periodontitis. The authors also investigated association of aforementioned receptors with clinical parameters of periodontitis. Clinical periodontal status was assessed in patients with very low and very high mRNA expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in periodontal tissues.

Material and methods

The study included 62 patients of UM Department of Periodontology, Wrocław aged

komórek pozytywnych dla TLR9 w nabłonkach dziąsłowych (łączącym i jamy ustnej) w zapaleniu dziąseł, a ich gwałtowna ekspresja pojawiała się w zapaleniu przyzębia głównie w warstwie podstawnej nabłonka jamy ustnej oraz we wszystkich warstwach nabłonka łączącego oraz przede wszystkim w podnabłonkowej tkance łącznej.⁸

Szczególne zainteresowanie w kontekście etiopatogenezy zapaleń przyzębia wzbudzają TLR2, TLR4 i TLR9 z powodu wiązanych przez nie bakteryjnych i wirusowych ligandów periopatogenów. TLR2 i TLR4 są obecne w błonie komórkowej zarówno komórek tkanek przyzębia oraz komórek napływowych. TLR2 rozpoznaje między innymi takie PAMP jak: lipoproteidy, peptoglikany, kwasy teichoiczne bakterii Gram-dodatnich, zymosan grzybów, LPS i fimbrie *Porphyromonas gingivalis*, LPS *Capnocytophaga ochracea*, sonicates (*Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*) białka wirusów cytomegalii oraz HSV-1, HSV-2 oraz białko gospodarza HSP70.^{3,9-11} Głównym ligandem dla TLR4 jest lipolisacharyd bakteryjny (m. in. *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*).^{3,11,12} Inne ligandy dla TLR4 to między innymi: taksol (substancja przeciwnowotworowa izolowana z kory cisu), mannan (*Candida sp.*), fibrynogen, siarczan heparyny, fibronektyna, oligosacharydy kwasu hialuronowego, endogenne HSP60 i 70.^{3,13} Z kolei głównym PAMPs dla TLR9 obecnych w obrębie endosomów jest wirusowy (HSV) i bakteryjny dwuniciowy DNA zawierający niemetylowane i hipometylowane sekwencje cytosine-phosphate-guanosine.⁹ Próby modyfikacji aktywności receptorów TLR za pomocą syntetycznych agonistów lub antagonistów służą wykryciu nowych leków, które być może będą wykorzystywane w leczeniu przewlekłych zakażeń.

Celem pracy była ocena ekspresji mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 w tkankach przyzębia u pacjentów z przewlekłym i agresywnym zapaleniem przyzębia oraz jej powiązanie z parametrami klinicznymi zapaleń przyzębia. Dodatkowo oceniano stan kliniczny przyzębia w przypadku bardzo niskiej i bardzo wysokiej ekspresji mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 w tkankach przyzębia.

17 to 70 years (average 48.0) including 33 women. All subjects were Polish Caucasians. The following exclusion criteria were adopted: systemic diseases affecting periodontitis (in particular diabetes, osteoporosis, hematological diseases, HIV infection), pregnancy, symptoms of severe infections of the oral cavity (herpetic gingivostomatitis), antibiotic, anti-inflammatory or immunosuppressive therapy in the past three months, periodontal treatment in the past twelve months, and current or former smoking habit (minimum of five years of abstinence). Subjects were disqualified if they did not have at least ten functionally efficient teeth. The diagnosis of periodontitis was based on the definition of moderate periodontitis by Page and Eke.¹⁴

Patients were divided into two subgroups: 34 people aged 39 to 70 years (average 58.0) including 17 women with chronic periodontitis (CP) and 28 people aged 17 to 52 years (average 35.25) including 12 women with generalized aggressive periodontitis (AgP). The criteria for the diagnosis of chronic periodontitis were as follows: presence of dental plaque or calculus, iatrogenic factors and anatomic abnormalities of teeth promoting dental plaque accumulation as well as slow clinical course of disease with exacerbations in single periodontal pockets.¹⁵ In the case of generalized aggressive periodontitis there was no association between the advancement of tissue destruction and the presence of dental plaque, and the clinical progression of the disease (an increase of the depth of periodontal pockets) was fast. Periodontal pockets (>5 mm) were present on the interdental surfaces of more than three permanent teeth other than first molars and central incisors.¹⁶

The control group consisted of 30 generally and periodontally healthy volunteers aged 27 to 47 years (average 32.13) including 13 women admitted to the Academic Dental Polyclinic in Wrocław for tooth extraction. All were Polish Caucasians. Exclusion criteria included systemic diseases that may affect the periodontal status, antibiotic, anti-inflammatory or immunosuppressive treatment in the past three months, pockets more than 3 mm deep and the value of the BoP index > 10%.¹⁷ All subjects in the control group had at least 26 teeth.

Material i metody

Do badania zakwalifikowano 62 pacjentów Zakładu Periodontologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu w wieku od 17 do 77 lat (średnia 48,0) w tym 33 kobiety. Wszyscy badani byli Polakami rasy kaukaskiej. Kryteriami wykluczenia z badań była choroba ogólna wpływająca na zapalenie przyzębia (w szczególności cukrzyca, osteoporoza, choroby hematologiczne, infekcja HIV), ciąża, objawy ostrej infekcji jamy ustnej (np. opryszczkowe zapalenie jamy ustnej i dziąseł), antybiotykoterapia, leczenie immunosupresyjne lub przeciwzapalne w przebiegu ostatnich 3 miesięcy, leczenie periodontologiczne w przebiegu ostatnich 12 miesięcy oraz aktualny lub były nikotynizm (minimalny okres abstynencji 5 lat). Badani byli dyskwalifikowani, jeśli nie mieli przynajmniej 10 wydolnych czynnościowo zębów. Rozpoznanie zapalenia przyzębia było stawiane z uwzględnieniem definicji średniozaawansowanego zapalenia przyzębia wg Page i Eke.¹⁴

Wyodrębniono 34 osoby w wieku od 39 do 70 lat (średnia 58,0), w tym 17 kobiet z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) oraz 28 osób w wieku od 17 do 52 lat (średnia 35,25), w tym 12 kobiet z uogólnionym agresywnym zapaleniem przyzębia (AgP). Kryteriami dla rozpoznania przewlekłego zapalenia przyzębia były obecność złogów nazębnych, zachyłków jatrogennych, nieprawidłowości anatomicznych zębów oraz długotrwały i powolny klinicznie przebieg choroby z zaostreniami w pojedynczych kieszonkach przyzębnych.¹⁵ W przypadku uogólnionego agresywnego zapalenia przyzębia nie stwierdzano zależności pomiędzy stopniem destrukcji tkanek oraz obecnością złogów nazębnych a postępem klinicznym choroby (wzrost głębokości kieszonek przyzębnych). Występowały kieszonki przyzębne (>5 mm) na powierzchniach międzystycznych przy więcej niż trzech zębach stałych innych niż pierwszy ząb trzonowy i siekacze przyśrodkowe.¹⁶

Grupę kontrolną stanowiło 30 ogólnie zdrowych osób w wieku od 27 do 47 lat (średnia 32,13), w tym 13 kobiet zgłaszających się do Akademickiej Polikliniki Stomatologicznej we Wrocławiu. U osób tych konieczna była ekstrak-

The study protocol was accepted by the Bioethics Committee of Wrocław Medical University (registered under 392/2010). Informed consent was obtained from all the subjects.

The clinical study was conducted in the Department of Periodontology, Wrocław Medical University. In the study group, fragment of gingival tissue was collected during surgical procedure under local anesthesia (articaine with adrenaline). This sample was obtained around tooth with periodontal pocket deeper than 6 mm with positive BoP index. In accordance with the manufacturer's instructions the material was submerged entirely in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) – 5 volumes of RNeasy Lysis Buffer to one volume of tissue. The samples were stored overnight at 2-8°C, and then frozen at -20°C. All patients with periodontal inflammation underwent comprehensive periodontal treatment. In the control group clinically healthy fragments of the gingiva were collected during tooth extraction (usually 3rd molars) performed for reasons not associated with periodontal pathology.

Clinical examination

The clinical study was conducted in artificial light by means of a dental mirror and a periodontal probe scaled every 1 mm. The following clinical parameters were evaluated: Plaque Index (PI) by *O'Leary* et al.,¹⁸ assessing the percentage of teeth surfaces (lingual and vestibular) with dental plaque; Approximal Plaque Index (API) by *Lange* et al.,¹⁹ BOP index (Bleeding on Probing) by *Ainamo* and *Bay*²⁰ assessed on four surfaces of all teeth; Papilla Bleeding Index (PBI) by *Saxer* and *Mühlemann*,²¹ PD1 – average value of pockets depth from all four surfaces of teeth; PD2 – the number of pockets deeper than 5 mm, CAL – Clinical Attachment Loss on four surfaces of all teeth and the number of teeth.

RNA isolation from the gingival tissue

Total RNA was extracted from the tissue using the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription reaction:

mRNA was transcribed into cDNA in a reverse

cja zębów ze wskazań poza periodontologicznych. Wszyscy byli Polakami rasy kaukaskiej. Zastosowano następujące kryteria wykluczenia: choroby ogólnoustrojowe mogące wpływać na stan przyzębia, antybiotykoterapia, leczenie immunosupresyjne lub przeciwzapalne w przebiegu ostatnich 3 miesięcy, głębokość kieszonek powyżej 3mm oraz wartość wskaźnika BoP>10%.¹⁷ Wszyscy badani w grupie kontrolnej mieli przynajmniej 26 zębów.

Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (numer zgody 392/2010). Od każdego badanego została pobrana pisemna zgoda na udział w badaniu.

Badanie kliniczne przeprowadzono w Zakładzie Periodontologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. W grupie badanej w znieczuleniu miejscowym artykainą z adrenaliną pobierano tkankę dziąsłową z okolicy najgłębszej kieszonki przyzębnej. Zgodnie z zaleceniami producenta materiał zatapiano w całości w RNeasy Lysis Buffer (Qiagen) – 5 objętości RNeasy Lysis Buffer na 1 objętość tkanki. Próbkę przechowywane były przez noc w temperaturze 2-8°C, a następnie zamrażane w temperaturze -20°C. Wszyscy pacjenci z zapaleniami przyzębia zostali następnie objęci kompleksowym leczeniem periodontologicznym. W grupie kontrolnej fragmenty zdrowego klinicznie dziąsła pobierano w trakcie zabiegu ekstrakcji zęba z przyczyn niezwiązanych z patologią przyzębia.

Badanie kliniczne

Badanie kliniczne prowadzono w oświetleniu sztucznym i wykorzystywano lusterko stomatologiczne oraz periodontometr wyskalowany co 1mm. Oceniano następujące parametry kliniczne: wskaźnik PI wg *O'Leary* i wsp.,¹⁸ oceniający w procentach występowanie płytki naddziąsłowej na powierzchniach przedsiónekowych i językowych zębów; wskaźnik API wg *Lange* i wsp.,¹⁹ wskaźnik krwawienia podczas sondowania (BoP Bleeding on Probing) wg *Ainamo* i *Bay*²⁰ na czterech powierzchniach każdego zęba; wskaźnik krwawienia z brodawek dziąsłowych (PBI – Papilla Bleeding Index) wg *Saxera* i *Mühlemanna*;²¹ PD1 – średnia głębokość kieszo-

transcription reaction using High-Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's recommendations. Obtained cDNA was stored at -20°C .

PCR reaction measured in real time (real-time PCR):

Examination of the mRNA expression levels of genes TLR2, TLR4, TLR9 was performed with relative method using primers and TaqMan probes labeled with FAM (Applied Biosystems). Results were normalized to endogenous control – GAPDH gene. The average from control samples was used as a calibrator. In the calculation of the quantitative coefficient $\text{RQ } 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ algorithm was used.

The single reaction included: 10 μl Taq Man Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 1 μl starter I probe for the gene IL-1B or GAPDH (Applied Biosystems), 6 μl cDNA (3-fold diluted RT reaction product). The sample was supplemented with water (Sigma) to 20 μl . Reactions were performed in triplicate on an ABI Prism 7900HT thermocycler (Applied Biosystems) according to the following profile:

- Initial denaturation for 20 seconds at 95°C ,
- Denaturation at 95°C for 1 second (40 cycles),
- Connection of probes and primers and synthesis of the DNA strand at 60°C for 20 seconds (40 cycles).

Statistical analysis

The verification of the hypothesis of equality of means in the two groups was performed by Mann-Whitney test. The verification of the hypothesis of equality of means of parameters in the three groups was performed by variance test or ANOVA ranks by Kruskal-Wallis (depending on the result of Levene's homogeneity of variance test). For parameters which showed significant statistical differences when comparing the three groups, post-hoc tests (contrasts analysis using Tukey's test) were performed. Selected pairs of parameters were analyzed by Spearman's correlation test. For each test p value 0.05 was considered statistically significant.

Statistical analysis was performed using Statistica 10.0.

nek na 4 powierzchniach wszystkich badanych zębów; PD2 – liczba kieszonek głębszych od 5 mm, CAL – utrata przyczepu łącznotkankowego na 4 powierzchniach wszystkich badanych zębów oraz liczba zębów w jamie ustnej.

Izolacja RNA z tkanki dziąsła

Fragmenty tkanki dziąsłowej od pacjentów przechowywano w stabilizatorze RNA later (Sigma), w -20°C . Całkowite RNA izolowano z tkanki przy użyciu zestawu NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel), zgodnie protokołem producenta.

Reakcja odwrotnej transkrypcji:

mRNA przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu High-Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems) według zaleceń producenta. Reakcję prowadzono w objętości 20 μl w następujących warunkach: 0,5 μg RNA, 2 μl 10xRT Buffer, 2 μl Random Primer (10x), 0,8 μl dNTPs mix (25x), 1 μl Multiscribe RT. Próbkę uzupełniano wodą do objętości 20 μl . Reakcję syntezy cDNA prowadzono przez 10 min w 25°C , a następnie przez 2 godziny w temperaturze 37°C . Po tym czasie enzym inaktywowano w temp. 85°C przez 5 minut. Tak otrzymane cDNA przechowywano w -20°C .

Reakcja PCR mierzona w czasie rzeczywistym (Real-time PCR):

Badanie poziomu ekspresji mRNA dla genów TLR2, TLR4, TLR9, przeprowadzono metodą względną z użyciem starterów i sond typu TaqMan znakowanych FAM (Applied Biosystems). Wyniki normalizowano względem endogennej kontroli – genu *GAPDH*. Jako kalibratora użyto średnią z prób kontrolnych. Przy obliczeniach współczynnika ilościowego RQ stosowano algorytm $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

W skład pojedynczej reakcji wchodziły: 10 μl Taq Man Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 1 μl starter I sonda dla genu IL-1B lub GAPDH (Applied Biosystems), 6 μl cDNA (3-krotnie rozcieńczony produkt reakcji RT). Próbkę uzupełniano wodą (Sigma) do 20 μl . Reakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach na termocyklerze ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) według następującego profilu:

Results

Table 1 shows the general characteristics of all subjects relating to age, sex, and evaluated clinical parameters. Significantly higher mean age in the CP group was observed ($p < 0.001$) comparing to AgP and control groups. All clinical parameters were substantially higher in periodontal inflammation compared to the control group except for the number of teeth in the AgP group.

Table 2 lists the average values of mRNA expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the studied groups. All patients with periodontitis had significantly higher expression of TLR4 ($p = 0.0007$) and TLR9 ($p = 0.0001$) compared to controls. TLR2 expression was not different in any of the groups. For variable TLR4 Kruskal-Wallis test rejects the hypothesis of distribution compliance in the three groups ($p = 0.0023$). With regard to control group the expression of TLR4 was significantly higher in both CP ($p = 0.01$) and AgP ($p < 0.000$) (Fig. 1). Also for the TLR9 variable Kruskal-Wallis test rejects the hypothesis of distribution compliance in the three groups ($p = 0.0002$). Compared to controls the expression of TLR9 was significantly higher in CP ($p < 0.000$) and AgP ($p = 0.005$) and in addition the expression of TLR9 was significantly higher in the CP with regard to AgP ($p < 0.000$) (Fig. 2).

All patients with periodontitis showed higher expression of TLR4 ($p = 0.006$) and TLR9 ($p = 0.005$) compared to the control group (TLR expression as a grouping variable). In the CP group variance test rejects the hypothesis of distribution compliance in three expressions of TLR ($p < 0.000$), which is only determined by a statistically higher level of TLR9 transcript ($p = 0.005$) with regard to TLR2 (Fig. 3). Also for the AgP group variance test rejected the hypothesis of distribution compliance in the three expressions of TLR ($p < 0.0000$). In this group, the highest average expression was TLR4 and it was significantly higher than TLR2 ($p = 0.002$) and TLR9 ($p = 0.048$) (Fig. 4). In the control group the mean values of examined TLR mRNA expression did not differ significantly.

There was no significant correlation between the expression of evaluated TLRs and clinical variables in all patients with periodontitis (data

- wstępna denaturacja przez 20 sekund w 95°C,
- denaturacja w 95°C przez 1 sekundę,
- przyłączanie sond i starterów oraz synteza nici DNA w 60°C przez 20 sekund.

Analiza statystyczna

Weryfikację hipotezy o równości średnich w dwóch grupach przeprowadzono testem Manna-Whitneya. Weryfikację hipotezy o równości średnich parametrów w trzech grupach przeprowadzono testem wariancji lub ANOVA rang Kruskala-Wallisa (w zależności od wyniku testu jednorodność wariancji Levene'a). Dla parametrów, dla których wykazano różnice istotnie statystyczne przy porównaniu 3 grup przeprowadzono test post-hoc – analizę kontrastów testem Tukeya. Dla wybranych par parametrów przeprowadzono analizę korelacji testem Spearmana. Dla każdego testu $p \leq 0.05$ uznawano za znaczące statystycznie.

Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Statistica 10.0.

Wyniki

W tabeli 1 przedstawiono ogólną charakterystykę badanych osób zawierającą wiek, płeć oraz oceniane parametry kliniczne. Stwierdzono istotnie wyższą średnią wieku w CP ($p < 0,001$) w odniesieniu do AgP oraz grupy kontrolnej. Wszystkie parametry kliniczne były istotnie wyższe w zapaleniach przyzębia w porównaniu do grupy kontrolnej za wyjątkiem liczby zębów w AgP.

W tabeli 2 zestawiono średnie wartości ekspresji mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 w badanych grupach. U wszystkich osób z zapaleniami przyzębia stwierdzono istotnie wyższe ekspresje TLR4 ($p = 0,0007$) i TLR9 ($p = 0,0001$) w porównaniu do kontroli. Ekspresja TLR2 nie różniła się znacząco w żadnej z ocenianych grup. Dla zmiennej TLR4 test Kruskala-Wallisa odrzuca hipotezę o zgodności rozkładów w trzech grupach ($p = 0,0023$). W odniesieniu do grupy kontrolnej ekspresje TLR4 były znacząco wyższe zarówno w CP ($p = 0,01$), jak i AgP ($p < 0,000$) (Fig. 1). Także dla zmiennej TLR9 test Kruskala-Wallisa zdecydowanie odrzuca hipotezę o zgodności rozkładu w trzech grupach ($p = 0,0002$). W porównaniu do kontroli ekspresja TLR9 była znacząco wyższa w

Table 1. Study population demographics

Variable	Chronic periodontitis (n=34)	Aggressive periodontitis (n=28)	Control group (n=30)	p
Age	58.0±8.48	35.25±7.61	32.13±4.17	<0.000
Sex – M/F	17/17	16/12	17/13	Ns
PI	58.32±24.37	29.62±20.77	17.8±10.7	<0.000
API	77.74±27.56	61.14±24.9	24.32±12.76	<0.000
BoP	46.13±23.16	43.3±27.32	6.32±4.28	<0.000
PBI	1.33±0.66	1.28±1.03	0.1±0.08	<0.000
PD1	3.9±0.56	4.32±0.95	2.12±0.23	<0.000
PD2 (median)	10,5	21	0	<0.000
CAL	4.62±3,88	4.02±3.95	0.55±0.38	<0.000
Number of teeth (median)	20,5	26	28	<0.000

Table 2. Mean expression values of TLR2, TLR4 and TLR9 in examined groups

Variable	Periodontitis (n=72)	Chronic periodontitis (n=34)	Aggressive periodontitis (n=28)	Control group (n=30)
Concentration of RNA	370.31±344.16	365.41±243.84	376.25±441.44	208.5±189.52
TLR2	2.04±1.67	2.24±1.75	1.81±1.55	1.61±1.68
TLR4	15.06±23.9	13.74±19.3	16.66±27.9	5.71±14.13
TLR9	15.17±36.18	22.44±47.48	6.36±7.4	2.12±3.75
Concentration of DNA	22.27±17.77	20.69±20.32	24.19±14.2	10.52±6.99

not shown). In this group there were significant correlations between the expressions of TLR2 and TLR4 ($R=0.66$, $p<0.000$), TLR2 and TLR9 ($R=0.59$, $p<0.000$) and TLR4 and TLR9 ($R=0.69$, $p<0.000$). In the CP group no significant associations between the expression of TLR and the clinical parameters were revealed (data not shown). Also this group showed significant correlations between the expressions of TLR2 and TLR4 ($R=0.61$, $p<0.000$), TLR2 and TLR9 ($R=0.41$, $p=0.016$) and TLR4 and TLR9 ($R=0.68$, $p<0.000$). The AgP group showed a significant positive correlation between TLR expression and dental plaque indices (TLR4 and PI: $R=0.43$,

CP ($p<0.000$) i AgP ($p=0,005$) oraz dodatkowo ekspresja TLR9 była istotnie wyższa w grupie CP w odniesieniu do AgP ($p<0.000$) (Fig. 2).

U wszystkich pacjentów z zapaleniami przyzębia stwierdzono wyższe ekspresje TLR4 ($p=0,006$) i TLR9 ($p=0,005$) w porównaniu do grupy kontrolnej (ekspresja TLR jako zmienna grupująca). W CP test wariancji odrzuca hipotezę o zgodności rozkładów w trzech ocenianych ekspresjach TLR ($p<0,000$), ale decyduje o tym jedynie statystycznie wyższy poziom transkryptu TLR9 ($p=0,005$) w odniesieniu do TLR2 (Fig. 3). Również dla AgP w teście wariancji odrzucono hipotezę o zgodności rozkładów w trzech ocenianych ekspresjach

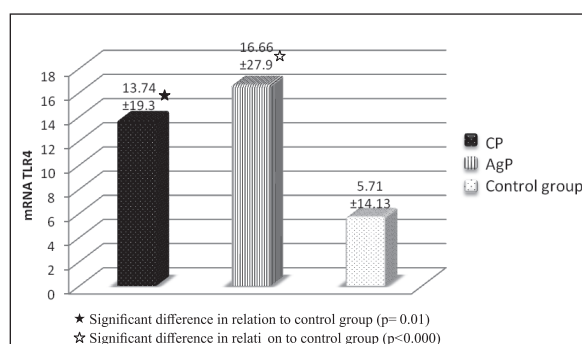


Fig. 1. TLR4 mRNA expression in chronic (CP) and aggressive (AgP) periodontitis.

Ekspresja mRNA TLR4 w przewlekłym (CP) i agresywnym (AgP) zapaleniu przyzębia.

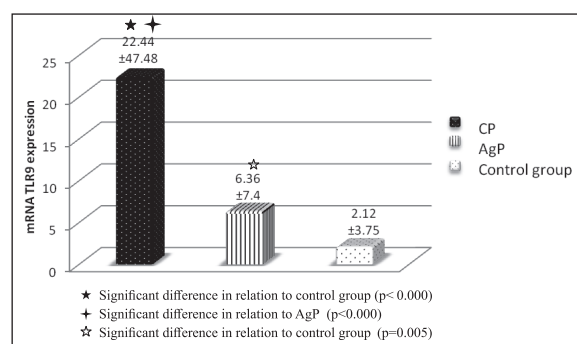


Fig. 2. TLR9 mRNA expression in chronic (CP) and aggressive (AgP) periodontitis.

Ekspresja mRNA TLR9 w przewlekłym (CP) i agresywnym (AgP) zapaleniu przyzębia.

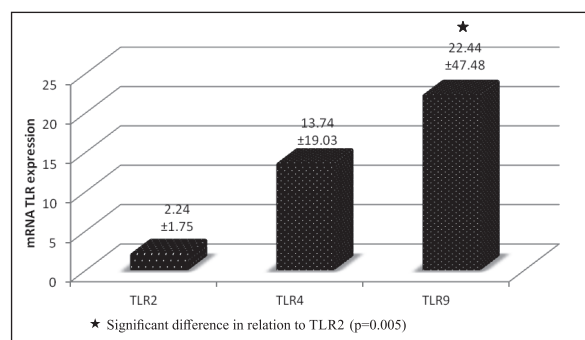


Fig. 3. mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 expression in chronic periodontitis (CP).
Ekspresja mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 w grupie z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

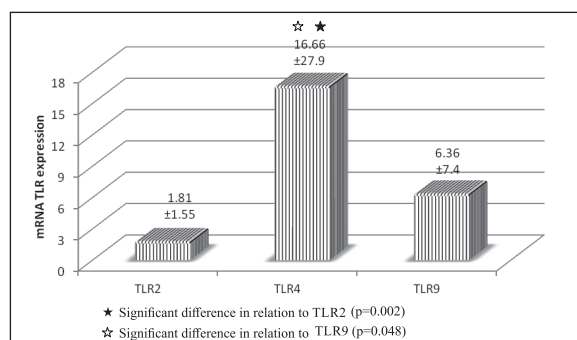


Fig. 4. mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 expression in aggressive periodontitis (AgP).

Ekspresja mRNA TLR2, TLR4 i TLR9 w grupie z agresywnym zapaleniem przyzębia (AgP).

$p=0.024$, TLR9 and PI: $R=0.39$, $p=0.041$; TLR2 and API: $R=0.41$, $p=0.031$; API and TLR9: $R=0.43$, $p=0.023$). In this group, significant positive correlation between the expression of TLR and the intensity of inflammation were found (TLR4 and PBI: $R=0.47$, $p=0.01$, and a TLR9: PBI $R=0.4$, $p=0.035$). There was also significant covariance between expressions of TLR2 and TLR4 ($R=0.8$, $p<0.000$), TLR2 and TLR9 ($R=0.79$, $p<0.000$) and TLR4 and TLR9 ($R=0.71$, $p<0.000$) in patients with AgP. In the control group, there was no significant correlation between the expression of TLRs and clinical parameters. However, this group also revealed significant correlations between the expressions of TLR2 and TLR4 ($R=0.68$, $p<0.000$) and TLR2 and TLR9 ($R=0.4$, $p=0.027$).

All subject were divided into two subgroups

TLR ($p<0,0000$). W rozpoznaniu tym najwyższa średnia ekspresja dotyczyła TLR4 i była ona znamienne wyższa od TLR2 ($p=0,002$) i TLR9 ($p= 0,048$) (Fig. 4). W grupie kontrolnej średnie ekspresje mRNA badanych receptorów nie różniły się istotnie.

Nie zaobserwowano istotnych korelacji pomiędzy ekspresją badanych TLR a zmiennymi klinicznymi u wszystkich osób z zapaleniami przyzębia (dane niepokazane). W grupie tej wykazano istotne współzmienności pomiędzy ekspresjami TLR2 a TLR4 ($R=0,66$, $p<0,000$), TLR2 a TLR9 ($R=0,59$, $p<0,000$) oraz TLR4 a TLR9 ($R=0,69$, $p<0,000$). W grupie z CP także nie ujawniły się znamienne korelacje pomiędzy ekspresją TLR a parametrami stanu klinicznego przyzębia (dane niepokazane). Także i w tej grupie

Table 3. Differences in clinical parameters between groups with low (TLR L) and high (TLR H) expression in gingival tissues of all examined (n=92)

Variable	TLR L	TLR H	p
TLR2			
PI	33.6±28.1	41.8±24.7	Ns
API	47.8±31.2	63.5±34	Ns
BoP	31.9±21.8	33.5±26.4	Ns
PBI	0.77±0.78	1.07±1.02	Ns
PD1	3.57±1.06	3.65±0.97	Ns
PD2	10.8±9.3	11.3±9.9	Ns
CAL	3.65±2.85	3.89±2.4	Ns
Number of teeth	25.1±3.9	23.3±4	Ns
TLR4			
PI	27.4±24.4	51.6±24.3	0.005
API	35.6±31.1	78.1±26.8	0.002
BoP	16.7±19.6	51.8±33.1	0.001
PBI	0.42±0.6	1.61±1.08	0.000
PD1	2.84±0.87	3.89±0.83	0.013
PD2	3.9±6.8	14.9±9.8	0.002
CAL	2.5±3.56	4.72±4.09	0.000
Number of teeth	25.5±4	22.1±4.9	0.025
TLR9			
PI	21.4±18.9	47.8±27.3	0.005
API	39.7±29.7	72.9±31.4	0.016
BoP	21.3±23.3	47.8±29.9	0.014
PBI	0.56±0.68	1.42±1.1	0.015
PD1	3.05±1.02	3.83±1.18	Ns
PD2	7.5±10.4	14.6±14.1	Ns
CAL	2.94±3.55	3.78±4.05	Ns
Number of teeth	26.1±3	24.2±3.6	Ns

according to values of expression of individual TLRs. 15 patients with the lowest expression of particular TLR were classified as TLR L group and 15 patients with the highest expression of particular TLR were classified as TLR H group. Table 3

wykazano istotne współzależności pomiędzy ekspresjami TLR2 a TLR4 ($R=0,61$, $p<0,000$), TLR2 a TLR9 ($R=0,41$, $p=0,016$) oraz TLR4 a TLR9 ($R=0,68$, $p<0,000$). W AgP stwierdzono istotne dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją

shows the differences in mean values of clinical parameters between TLR L and TLR H groups. There was no reason to reject the hypothesis of equality of clinical variables means between TLR2 L and TLR2 H. Significantly higher mean values of the periodontal variables and a lower number of teeth were found in subjects with the highest expression of TLR4. In turn, patients with the highest expressions of TLR9 showed significantly higher values of only dental plaque, the intensity and extent of inflammation indices.

Discussion

All the available literature reports document the expression of TLR mRNA in the gingival tissue only in chronic periodontitis.²²⁻²⁸ In the present study, TLR9 had the highest mRNA expression in the gingival tissue in chronic periodontitis and it was significantly increased when compared to TLR2. Sarah et al.²² evaluated expression of TLR4 and TLR2 mRNA in CP and found a substantially higher expression of TLR4 transcript. The patients from our study diagnosed with CP showed no relevant differences in TLR2 mRNA expression comparing to the control group, which was not observed by other authors.^{22,23,25,26} Only De Oliveira et al.²⁴ did not establish any difference between the expression of TLR2 mRNA evaluated in clinically healthy gingiva and gingival tissue obtained from smokers and non-smokers with CP. Authors explain declining TLR2 gene expression in the course of periodontitis with the influence of the partial and complete methylation which regulates the transcription of the mRNA in the promoter regions of these genes. This was confirmed by de Faria Amormino et al.²⁸ who observed a significantly ($p < 0.001$) higher TLR2 gene hypermethylated profile in CP and positive correlation between the degree of methylation of this gene with number of cells in inflammatory infiltration and PD. Our study confirmed a significant increase in the TLR4 mRNA expression in the course of CP in relation to controls as described previously by other authors,^{22,23,25} although without confirmation from all of them.^{24,26} The rise of this expression is probably caused by the domination of Gram-negative periopathogens

TLR a obecnością płytki nazębnej (TLR4 a PI - $R=0,43$, $p=0,024$, TLR9 a PI - $R=0,39$, $p=0,041$; TLR2 a API - $R=0,41$, $p=0,031$; TLR9 a API - $R=0,43$, $p=0,023$). W AgP wykazano również znamienne dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją TLR a intensywnością stanu zapalnego (TLR4 a PBI - $R=0,47$, $p=0,01$ oraz TLR9 a PBI - $R=0,4$, $p=0,035$). Występowały również istotne współzmienności w AgP pomiędzy ekspresjami TLR2 a TLR4 ($R=0,8$, $p < 0,000$), TLR2 a TLR9 ($R=0,79$, $p < 0,000$) oraz TLR4 a TLR9 ($R=0,71$, $p < 0,000$). W grupie kontrolnej nie stwierdzono znamiennych korelacji pomiędzy ekspresją TLR a parametrami stanu klinicznego przyzębia, natomiast ujawniły się istotne współzmienności pomiędzy ekspresjami TLR2 a TLR4 ($R=0,68$, $p < 0,000$) oraz TLR2 a TLR9 ($R=0,4$, $p=0,027$).

Dla każdej ekspresji mRNA TLR wydzielono z całej badanej grupy dwie podgrupy w zależności od skrajnych wartości, zaliczając do grupy z najniższą ekspresją (TLR L) 15 obserwacji z najniższą ekspresją, a do grupy z najwyższą ekspresją (TLR H) 15 obserwacji z najwyższą ekspresją. W tabeli 3 pokazano różnice w średnich wartościach parametrów klinicznych pomiędzy TLR L a TLR H. Nie stwierdzono podstaw do odrzucenia hipotezy o równości średnich zmiennych klinicznych pomiędzy TLR2 L a TLR2 H. Wykazano znamienne wyższe średnie wartości zmiennych periodontologicznych i niższą liczbę zębów u osób z najwyższą ekspresją TLR4. Z kolei u osób z najwyższymi ekspresjami TLR9 wykazano znamienne wyższe wartości tylko wskaźników płytki nazębnej oraz intensywności i rozległości stanu zapalnego.

Dyskusja

Wszystkie dostępne w piśmiennictwie prace dokumentują ekspresję mRNA TLR wyłącznie w tkance dziąsłowej w przewlekłym zapaleniu przyzębia.²²⁻²⁸ W badaniu własnym najwyższa ekspresja mRNA w tkance dziąsłowej w CP dotyczyła TLR9 i była ona znamienne wyższa w odniesieniu do TLR2. Tylko Sarah i wsp.²² oceniali w CP różnice pomiędzy ekspresją mRNA TLR4 a TLR2 i stwierdzili znamienne wyższą ekspresję transkryptu TLR4. U naszych pacjentów z CP

during subsequent episodes of clinical exacerbation of the periodontopathy. Expressions of TLRs are not constant, but vary with the duration of the disease. This probably explains the discrepancy in observations of TLR4 mRNA levels in CP. As the number of TLR-positive cells is rising, negative regulation of TLR2 (30-fold reduction) and TLR4 (9-fold reduction) occurs.²⁹ Probably macrophages in response to repeated exposure to PAMPs of periopathogens from biofilm develop negative regulation of TLRs expression, as a manifestation of local tolerance to endotoxins. Smaller decrease in the expression of TLR4 during this negative feedback may be explained by the constant expression of this receptor at a higher level than in the tissues of clinically healthy individuals. It has been shown that continuous LPS stimulation eventually induces a decrease in expression of TLR4, and possible cross-tolerance to other TLR agonists.²⁹ It seems that this may be one of many mechanisms that reduces proinflammatory cytokine production, and thus limits the extent of associated destruction of periodontal tissues. Differences in the expression of TLR between studies may also result from the impact of confounders – in our opinion the age of subjects was not controlled.

Based on present results and in agreement with other authors,^{23,26,27} expression of TLR9 can be associated with the clinical course of chronic periodontitis. This is evidenced by far the highest expression of TLR9 mRNA in CP with respect to the two other studied receptors as well as significantly higher expression of TLR9 mRNA in comparison not only with healthy gingiva, but also with that obtained from subjects with AGP. *Kajita et al.*²³ observed significant difference ($p < 0.00001$) of TLR9 mRNA expression in the gingival tissue during CP as compared to gingivitis. This was confirmed by observations of *Wara-aswapati et al.*,²⁶ who also described significantly higher ($p = 0.008$) TLR9 mRNA expression in CP patients relative to clinically healthy gingiva. Most spectacular in this regard are studies by *Sahingura et al.*²⁷ In the course of CP they showed a 7.8-fold increase in cytoplasmic expression of sensory TLR9 mRNA, and it

ekspresja mRNA TLR2 nie różniła się znacząco od grupy kontrolnej, czego nie obserwowali inni autorzy.^{22,23,25,26} Tylko *De Oliveira* i wsp.²⁴ nie wykazali różnicy między ekspresją mRNA TLR2 ocenianą w zdrowym klinicznie dziąśle i w dziąśle pacjentów palących i niepalących z CP. Autorzy ci spadającą ekspresję genu TLR2 w przebiegu zapalenia przyzębia tłumaczą wpływem częściowej i całkowitej metylacji, która reguluje transkrypcję mRNA w regionach promotorowych tych genów. Potwierdziły to badania *de Faria Amormino* i wsp.,²⁸ którzy zaobserwowali istotnie ($p < 0,001$) wyższy hipermetylowany profil genu TLR2 w CP oraz pozytywną współzmiennność zakresu metylacji tego genu z liczbą komórek w nacieku zapalnym oraz PD. Badania własne potwierdziły znaczący wzrost ekspresji mRNA TLR4 w przebiegu CP w odniesieniu do kontroli, co opisywali wcześniej inni autorzy,^{22,23,25} chociaż nie wszyscy to potwierdzali.^{24,26} Wzrost tej ekspresji jest zapewne wyrazem dominacji Gram-ujemnych periopatogenów w trakcie kolejnych epizodów zaostrzenia klinicznego tej periodontopatii. Ekspresje TLR nie są stałe, lecz zmieniają się wraz z trwaniem choroby. To zapewne tłumaczy takie rozbieżności w obserwacjach poziomów mRNA TLR4 w CP. Wraz ze wzrostem liczby komórek posiadających receptory Toll-podobne następuje negatywna regulacja mRNA dla TLR2 (30-krotne obniżenie) i TLR4 (9-krotne obniżenie).²⁹ Prawdopodobnie to makrofagi w odpowiedzi na powtarzające się ekspozycje na PAMP periopatogenów biofilmu rozwijają negatywną regulację ekspresji TLR, jako wyraz miejscowej tolerancji na endotoksyny. Mniejszy spadek ekspresji TLR4 podczas tego ujemnego sprzężenia zwrotnego może tłumaczyć ciągłe utrzymywanie się średniej ekspresji tego receptora na poziomie wyższym niż w tkankach klinicznie zdrowych. Pokazywano, że kolejne stymulacje LPS indukują w końcu spadek ekspresji TLR4 oraz możliwość powstawania krzyżowej tolerancji na innych agonistów TLR.²⁹ Wydaje się, że może to być jeden z wielu mechanizmów wygaszania produkcji cytokin prozapalnych oraz ograniczania tym samym zakresu towarzyszącego uszkodzenia tkanek przyzębia. Różnice w wynikach ekspresji TLR pomiędzy badaniami mogą również wynikać z oddziały-

was the highest increase of TLR compared to clinically healthy gingiva. Periodontal pockets apart from classic periopathogens are a reservoir for viruses mainly of the *Herpesviridae* family, as evidenced by seropositivity for HSV, CMV and EBV in nearly all patients with periodontitis and also a significant increase in IFN- α 1 transcript.²³ Significant positive correlation between the TLR9 mRNA expression and the number of *P. gingivalis* in subgingival biofilm was demonstrated.²⁶ Therefore, an increase in mRNA expression of TLR9 in the course of CP may be a result of local exposure to bacterial and viral ligands.

The available literature does not provide studies on the qualitative and quantitative presence of TLR mRNA in aggressive periodontitis. Our findings point to the particular importance of TLR4 in the course of these periodontopathies. Indeed, AgP demonstrated the highest expression of TLR4 mRNA significantly different from other two Toll-Like Receptors evaluated in this paper. Furthermore, this receptor's transcript levels in the gingival tissue obtained from patients with AgP was significantly higher compared to the control group. The generalized form of AgP is specifically associated with the most virulent Gram-negative periopathogens of the red complex. The dynamics of this disease is much greater than CP; subsequent exacerbations last longer and include many teeth. Perhaps during the course of AgP local tolerance to endotoxin does not develop as described for CP.²⁹ However, this speculation requires confirmation. High expression of TLR4 mRNA in aggressive generalized periodontitis may also be associated with the very rare TLR4 gene promoter methylation in the course of periodontitis.²⁴

In our study, the two-way analysis (mRNA expression of TLR and clinical parameters) showed significant positive correlations only in the case of AgP. It applied to all studied TLRs and indicators of dental plaque present on all surfaces of the teeth (PI and API) and also expression of only TLR4 and TLR9 and periodontal inflammation intensity (PBI index). In chronic periodontitis, we were unable to show any significant association between the mRNA expression of TLRs and clinical parameters. *Yoshioka et al.*³⁰ evaluated the

wania zmiennych zakłócających – w ocenie własnej nie kontrolowano wieku.

Na podstawie badań własnych oraz wcześniejszych innych autorów^{23,26,27} można w sposób szczególnie łączyć ekspresję TLR9 z klinicznym przebiegiem przewlekłego zapalenia przyzębia. Świadczy o tym zdecydowanie najwyższa ekspresja mRNA TLR9 w CP w odniesieniu do dwóch pozostałych receptorów, a także istotnie wyższa ekspresja w zestawieniu nie tylko ze zdrowym dziąsłem, ale i pozyskanym od osób z AgP. *Kajita i wsp.*²³ obserwowali bardzo znaczącą różnicę ($p < 0,00001$) w ekspresji mRNA TLR9 w tkance dziąsła w CP w porównaniu do zapalenia dziąseł. Potwierdzają to obserwacje *Wara-aswapati i wsp.*,²⁶ którzy w CP również opisywali znacznie wyższą ($p = 0,008$) ekspresję mRNA TLR9 w odniesieniu do klinicznie zdrowego dziąsła. Najbardziej spektakularne w tym względzie są badania *Sahingura i wsp.*,²⁷ którzy w przebiegu CP wykazywali 7,8-krotny wzrost ekspresji cytoplazmatycznego sensorycznego mRNA TLR9 i był to najwyższy wzrost TLR w odniesieniu do klinicznie zdrowego dziąsła. W kieszonkach przyzębnych oprócz klasycznych periopatogenów występują wirusy, głównie z rodziny *Herpesviridae*, o czym świadczy seropozytywność dla HSV, CMV i EBV u prawie wszystkich pacjentów z *periodontitis*, a także istotny wzrost transkryptu IFN- α 1.²³ Wykazywano istotną pozytywną korelację pomiędzy ekspresją mRNA TLR9 a liczbą *P. gingivalis* w biofilmie poddziąsłowym.²⁶ Dlatego też wzrost ekspresji mRNA TLR9 w przebiegu CP jest wyrazem miejscowej ekspozycji na ligandy bakteryjno-wirusowe.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac dotyczących jakościowego i ilościowego występowania mRNA TLR w agresywnym zapaleniu przyzębia. Badania własne wskazują na szczególne znaczenie TLR4 w przebiegu tych periodontopatii. W AgP wykazano bowiem najwyższą ekspresję mRNA TLR4 różniącą się istotnie od dwóch pozostałych badanych receptorów Toll-podobnych. Dodatkowo poziom transkryptu tego receptora w tkance dziąsłowej pobranej od pacjentów z AgP był znacznie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Uogólniona postać AgP jest

effect of supragingival plaque on TLR2 or TLR4-dependent induction of nuclear factor kappa B (NF- κ B). They found a direct relationship between the amount of dental plaque and levels of TLR2 and TLR4, as well as between dental plaque (obtained from active sites in the course of periodontitis) and levels of these receptors. In turn, dental plaque isolated from deep pockets (PD \geq 4mm) induced significantly lower levels of TLR2 than the one from shallow pockets. For TLR4, this correlation was reversed. This study illustrates the relationship between the currently dominant microbiologic spectrum of dental plaque and pattern of TLR expression. Initially, dominance of Gram-positive bacteria increases expression of TLR2. With the shift in the direction of Gram-negative bacteria TLR2 expression decreases and TLR4 rises. It also shows the ability of supragingival plaque to stimulate via TLR4 secretion of TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10 by mononuclear cells isolated from peripheral blood of periodontally and generally healthy individuals.¹² The present study evaluated the association between mRNA expression of examined TLR and supragingival plaque in cases of deep periodontal pockets (PD \geq 5mm). This relationship was confirmed only for aggressive periodontitis. A significant positive correlation between the mRNA expression of TLR4 and TLR9 and the intensity of inflammation in AgP seems to depend secondarily on the covariance with dental plaque. Lack of correlation between the amount of supragingival plaque and mRNA expression of examined TLRs in CP may indicate some degree of tolerance to bacterial ligands developed during long-lasting stimulation. The two-way analysis showed different involvement of Toll-like receptors in the course of either aggressive or chronic periodontitis. In AgP there was no direct association between the expression of TLRs and the depth of the pockets, the number of pockets greater than 5 mm and loss of attachment; however, the highest correlation ratios between the expression of TLR4 and PI and PBI indicators seem to suggest the continuous nature of this stimulation and its negative consequences for the periodontal tissues.

The present study showed correlation between mRNA expressions of examined TLRs within

najbardziej związana ze szczególnie wirulentnymi Gram-ujemnymi periopatogenami kompleksu czerwonego. Dynamika tej choroby jest o wiele większa niż CP, kolejne zaostżenia trwają dłużej i obejmują wiele zębów. Być może w przebiegu tych najcięższych w przebiegu klinicznym periodontopatii nie rozwija się miejscowa tolerancja na endotoksynię opisaną w CP.²⁹ Spekulacja ta wymaga potwierdzenia. Wysoka ekspresja mRNA TLR4 w AgP może być także związana z bardzo rzadką metylacją promotora genu TLR4 w przebiegu zapalenia przyzębia.²⁴

W badaniach własnych w analizie dwuczynnikowej (ekspresja mRNA TLR-parametry stanu klinicznego) dodatnie istotne korelacje stwierdzono jedynie dla AgP. Dotyczyły one wszystkich badanych ekspresji mRNA TLR ze wskaźnikami płytki nazębnej występującej na wszystkich powierzchniach zębowych (wskaźniki PI i API) oraz korelacji ekspresji mRNA TLR4 i TLR9 z intensywnością stanu zapalnego przyzębia (wskaźnik PBI). W przewlekłym zapaleniu przyzębia nie wykazano żadnej istotnej współzmienności między ekspresją mRNA badanych TLR a wskaźnikami periodontologicznymi i liczbą zębów. *Yoshioka* i wsp.³⁰ oceniali wpływ płytki naddziąsłowej na zależną od TLR2 lub TLR4 indukcję czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B). Stwierdzili wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ilością płytki a poziomem TLR2 i TLR4, jak również pomiędzy płytką izolowaną przy aktywnym stanie zapalnym a poziomami tych receptorów. Z kolei płytka izolowana w przypadku głębokich kieszonek (PD \geq 4mm) indukowała istotnie niższy poziom TLR2 niż płytka z kieszonek płytszych, dla TLR4 zależność ta była odwrotna. Badanie to bardzo dobrze ilustruje zależność pomiędzy aktualnie dominującym spektrum mikrobiologicznym płytki a typem TLR podlegającym ekspresji. Początkowo wraz z dominacją bakterii Gram-dodatnich wzrasta ekspresja TLR2, wraz z przesunięciem w kierunku bakterii Gram-ujemnych spada ekspresja TLR2 i wzrasta TLR4. Wykazano także zdolność płytki naddziąsłowej do stymulacji *via* TLR4 wydzielania TNF- α , IL-6, IL-8 i IL-10 przez komórki jednojądrzaste izolowane z krwi obwodowej osób ogólnie i periodontologicznie zdrowych.¹²

each group. This is confirmed by observations of *Sahingura et al.*²⁷ which showed significant ($p < 0.0001$) positive correlation between TLR4 and TLR2, but also, for example between TLR9 and TLR8. This indicates that the mixed infection of periodontal pockets (bacterial, viral and sometimes fungal) triggers various patterns of PAMPs recognition by TLRs and cooperation of extracellular and intracellular receptors in immuno-inflammatory responses. Periodontitis is dominated mainly by bacteria, especially Gram-negative (LPS) which, depending on the origin, stimulate the expression of various Toll-like receptors. Joint development of TLRs expression in healthy individuals (especially extracellular TLR2 and TLR4) suggests the involvement of TLRs present in the epithelium (junctional and oral) in maintaining the balance between their activation by the commensal microorganisms and tolerance to their differentiation products.

In order to determine the role of examined TLRs in protecting against or promoting the course of periodontitis all subjects were divided according to levels of mRNA of each TLR expression independent of periodontal diagnosis. There were no significant differences between the mean values of clinical parameters in TLR2 L and TLR2 H groups. This was another proof that TLR2 has the smallest impact on long-lasting course of periodontitis. This is a key receptor for the detection of early micro-organisms in dental plaque and hence its high expression in gingival inflammation, as demonstrated by *Sarah et al.*²² Completely different results were observed when clinical status between the groups TLR4 L and TLR4 H was compared. It was shown that for high expression of TLR4 mRNA periodontal indicators of dental plaque, extent and intensity of inflammation, pocket depth, attachment loss and even the number of teeth were significantly worse than in the case of low expression. Very interesting is the number of periodontal pockets deeper than 5 mm: four in the case of low TLR4 mRNA expression compared with fifteen for the TLR4 H group. This shows that the high expression of TLR4 mRNA is associated with the intensity and generalization of periodontitis and progression of

W badaniach własnych oceniano związek ekspresji mRNA badanych TLR z płytką naddziąsłową w sytuacji obecności głębokich kieszonek przyzębnych ($PD \geq 5\text{mm}$). Potwierdzono taką zależność tylko dla agresywnego zapalenia przyzębia. Istotna dodatnia korelacja ekspresji mRNA TLR4 i TLR9 z intensywnością stanu zapalnego w AgP wydaje się wtórnie zależeć od współzmienności z płytką. Brak korelacji pomiędzy ilością płytki naddziąsłowej a ekspresją transkryptu badanych TLR w CP może wskazywać na rozwiniętą tolerancję na ligandy bakteryjne podczas długotrwałej stymulacji w tej periodontopatii. Analiza dwuczynnikowa pokazała odmienne zaangażowanie receptorów Toll-podobnych w przebieg agresywnego i przewlekłego zapalenia przyzębia. Mimo, że w AgP nie wykazano bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją TLR a głębokością kieszonek, liczbą kieszonek powyżej 5 mm i utratą przyczepu, to jednak najwyższe współczynniki korelacji pomiędzy ekspresją TLR4 a wskaźnikami PI i PBI zdają się wskazywać na ciągły charakter tego pobudzenia z negatywnymi tego konsekwencjami dla tkanek przyzębia.

W badaniach własnych wykazano współzmiennosc ekspresji mRNA badanych TLR między sobą w każdej grupie osób z zapaleniem przyzębia oraz u osób periodontologicznie zdrowych. Potwierdzają to obserwacje *Sahingura* i wsp.²⁷ pokazujące istotne ($p < 0,0001$) dodatnie korelacje pomiędzy TLR4 a TLR2, ale również np. pomiędzy TLR9 a TLR8 ze współczynnikiem korelacji 0,69. Wskazuje to, że mieszane zakażenie kieszonek (bakteryjno-wirusowe a niekiedy grzybicze) uruchamia różne formy rozpoznawania PAMP przez TLR i kooperację receptorów zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych w odpowiedzi immunologiczno-zapalnej. W zapaleniach przyzębia dominują bakterie, głównie Gram-ujemne z LPS, który w zależności od pochodzenia także stymuluje ekspresję różnych receptorów Toll-podobnych. Wspólny rozwój ekspresji TLR u osób zdrowych (szczególnie zewnątrzkomórkowych TLR2 i TLR4) sugeruje zaangażowanie TLR obecnych na nabłonkach dziąsła (łączyjącym i jamy ustnej) w utrzymanie równowagi między ich aktywacją przez komensalne drobnoustroje jamy

destruction in periodontal ligaments and alveolar bone. These findings cannot be explained only by the reaction to dental plaque as is the case in the two-way model. Perhaps increased expression of TLR4 is associated with periods of “outbursts” of periodontitis. These results can be also interpreted with caution, namely during exacerbations in particular conditions of exposure to the whole spectrum of Gram-negative bacterial biofilm, the initiation of TLR4 signaling pathway may lead to massive secretion of pro-inflammatory cytokines, and in turn to destruction of periodontal ligaments and increased osteoclasts activity. This is certainly not the only pathological mechanism during periods of exacerbations, but it needs further research in times of remission, taking into account the changing numbers of bacteria in the biofilm and also epigenetic and genetic markers. It is very important because severe proinflammatory cytokine production through TLR4 signaling pathway induced by biofilm from periodontal pockets deeper than 5mm can affect peripheral monocytes.¹² This may have consequences for general health, for instance in destabilization of atheromatous plaque.

The TLR9 H group had significantly higher rates of dental plaque indicators, the intensity and extent of inflammatory indicators in the absence of differences in the pocket depth, loss of attachment and the number of teeth when compared to TLR9 L group. This shows that the expression of TLR9 is stimulated by the biofilm, and that association between this expression and the intensity of inflammation is secondary. It does not seem, however, that increased expression of TLR9 is related to progression of destructive periodontal changes. Unlike TLR2 and TLR4, higher TLR9 expression occurs only in periodontitis.⁸ It cannot be excluded that such intracellular bacterial and viral infection of periodontal pockets is responsible for the initiating of the TLR9 signaling pathway that leads to the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- β . Invasion of periopathogens into cells such as epithelial cells is one of the aspects of their virulence and rapid recolonization of pockets after periodontal treatment. Therefore, intracellular defence mechanisms of infection may

ustnej a tolerancją na ekspozycję na ich zróżnicowane produkty.

W celu określenia związku badanych TLR z ochroną lub promowaniem przebiegu periodontopatii podzielono statusy kliniczne tylko pod względem ekspresji transkryptów tych receptorów zupełnie niezależnie od rozpoznania periodontologicznego. Nie wykazano znamienych różnic pomiędzy średnimi wartościami wskaźników periodontologicznych w grupach TLR2 L i TLR2 H. Jest to kolejny dowód, że z ocenianych receptorów Toll-podobnych TLR2 ma najmniejszy związek z wieloletnim przebiegiem zapaleń przyzębia. Jest to kluczowy receptor dla rozpoznawania wczesnych drobnoustrojów płytki i dlatego jego ekspresje są tak wysokie w zapaleniach dziąseł, co pokazały badania Sarah i wsp.²² Zupełnie inną obserwację przyniosło porównanie statusów klinicznych pomiędzy grupami TLR4 L a TLR4 H. Wykazano, że w przypadku wysokiej ekspresji mRNA TLR4 stan kliniczny przyzębia wyrażający się wskaźnikami płytki, rozległości i intensywności zapalenia, głębokości kieszonek, utraty przyczepu, a nawet liczby zębów był znamienne gorszy niż w przypadku niskiej ekspresji. Bardzo spektakularna jest tu obserwacja dotycząca liczby kieszonek przyzębnych powyżej 5 mm – 4 w przypadku niskiej ekspresji mRNA TLR4 w porównaniu do 15 dla grupy TLR4 H. Dowodzi to, że wysoka ekspresja mRNA TLR4 związana jest z nasileniem i uogólnieniem stanu zapalnego przyzębia oraz z progresją zmian destrukcyjnych w ozębnej i kości wyrostka zębodołowego. Wpływu tego nie da się wytłumaczyć tylko reakcją na obecność płytki, jak w przypadku modelu dwuczynnikowego. Być może jest tak, że wzrost ekspresji TLR4 związany jest z okresami „wybuchów” aktywności klinicznej periodontopatii. Wyniki te można również ostrożnie interpretować w taki sposób, że w okresach zaostrzeń w warunkach szczególnej ekspozycji na działanie całego spektrum bakterii Gram-ujemnych biofilmu uruchomienie szlaku sygnałowego TLR4 może prowadzić do tak masywnego wydzielania cytokin prozapalnych, że przekłada się to na destrukcję ozębnej i nasilenie aktywności osteoklastów. Z pewnością nie jest to jedyny mechanizm etiopatologiczny zmian de-

be critical for reducing persistent inflammation.

The concept of linking high and low expression of TLR transcripts in the gingival tissue with the clinical status regardless of periodontal diagnosis provided new information. In comparison with the two-way analysis in periodontitis it showed correlation between high TLR4 mRNA expression and destruction of periodontal tissues and lack of such association for the high expression of TLR9 mRNA. A limitation of all these observations, however, is the variability of TLR expression in the course of periodontitis, which should be subject to further research.

Conclusions

In chronic periodontitis particularly important is expression of TLR9, whereas in generalized aggressive periodontitis – TLR4. The two-way analysis showed relevant correlation between expression of mRNA of TLR4 and TLR9 and the amount of supragingival plaque and intensity of gingival inflammation only for aggressive periodontitis. Apart from clinical diagnosis, high expression of TLR4 mRNA in the gingiva is associated with the severity and generalization of periodontitis. Also the progression of destructive changes during the course of this disease might be associated with high expression of mRNA TLR4. On the other hand, high expression of TLR9 mRNA is linked mainly to the amount of dental plaque.

strukcyjnych w przyzębiu w okresach zaostrzeń, ale jest on wart pogłębionych badań w odniesieniu i do okresów remisji choroby, i do liczbowych przesunięć bakterii w biofilmie oraz do markerów genetycznych i epigenetycznych. Jest to o tyle ważne, że nasilona produkcja cytokin prozapalnych poprzez szlak sygnałowy TLR4 wywołany biofilmem z kieszonek powyżej 5 mm może dotyczyć monocytów obwodowych,¹² a to może mieć swoje konsekwencje dla zdrowia ogólnego, np. dla destabilizacji blaszki miażdżycowej. W przypadku grupy TLR9 H stwierdzono istotnie wyższe wskaźniki płytki oraz intensywności i rozległości zmian zapalnych przy braku różnicy w głębokościach kieszonek, utracie przyczepu i liczby zębów w porównaniu do osób z niską ekspresją mRNA TLR9. Wskazuje to jedynie na stymulację ekspresji TLR9 przez biofilm i wtórny do biofilmu związek tej ekspresji z intensywnością oraz rozległością stanu zapalnego przyzębia. Nie wydaje się natomiast, aby wzrost ekspresji TLR9 był związany z progresją zmian destrukcyjnych przyzębia. W przeciwieństwie do TLR2 i TLR4 do wyraźnej ekspresji TLR9 dochodzi dopiero w zapaleniu przyzębia.⁸ Nie można wykluczyć, że takie wewnątrzkomórkowe bakteryjno-wirusowe zakażenie kieszonek przyzębnych odpowiada za nasilenie szlaku sygnałowego TLR9, który prowadzi do syntezy cytokin prozapalnych i INF-β. Inwazja periopatogenów do wnętrza komórek, np. nabłonkowych jest jednym z aspektów ich wirulencji i szybkiego rekolonizowania kieszonek po leczeniu periodontologicznym. Dlatego mechanizmy obronne efektorowe dla zakażeń wewnątrzkomórkowych mogą być krytyczne dla ograniczenia zapalenia przewlekłego.

Przyjęta koncepcja powiązania wysokiej i niskiej ekspresji transkryptów TLR w dziąśle ze stanem klinicznym przyzębia niezależnie od rozpoznania periodontologicznych dała nowe informacje. W porównaniu do analiz dwuczynnikowych w zapaleniach przyzębia pokazała związek wysokich ekspresji mRNA TLR4 ze zmianami destrukcyjnymi w przyzębiu oraz brak takiej zależności dla wysokich ekspresji mRNA TLR9. Ograniczeniem tych wszystkich obserwacji jest jednak zmienność ekspresji TLR w czasie trwa-

nia periodontopatii, co powinno być tematem następnych badań.

Wnioski

W przewlekłym zapaleniu przyzębia niezwykle istotną wydaje się być ekspresja TLR9, a w przypadku uogólnionego agresywnego zapalenia przyzębia TLR4. Analiza dwuczynnikowa pokazała istotne korelacje pomiędzy ekspresją mRNA dla TLR4 i TLR9 a ilością naddziąsłowej płytki nazębnej oraz intensywnością zapalenia tylko w przypadku agresywnej postaci choroby. Pomijając rozpoznanie kliniczne, wysoki poziom mRNA dla TLR4 jest powiązany z ciężkością i rozległością periodontitis oraz dodatkowo progresją oraz destrukcją aparatu zawieszeniowego zębów. Z drugiej strony wysoki poziom mRNA dla TLR9 został powiązany głównie z ilością płytki nazębnej.

References

1. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
2. Krauss JL, Potempa J, Lambris JD, Hajishengallis G: Complementary Tolls in the periodontium: How periodontal bacteria modify complement and Toll-like receptor responses to prevail in the host. *Periodontol* 2000 2010; 52: 141-162.
3. Mayank H, Veenu Madaan H: Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci* 2011; 53: 263-271.
4. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14.
5. Beklen A, Hukkanen M, Richardson R, Kontinen YT: Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 1-10 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 425-431.
6. Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y: Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 54-58.
7. D'Souza RS, Bhat KG, Sailaja D, Babji DV, Bandiwadekar TK, Katgalkar RM: Analysis of expression and localization of TLR-2 by immunofluorescent technique in healthy and inflamed oral tissue. *J Clin Diag Res* 2013; 7: 2780-2783.
8. Chen YC, Liu CM, Jeng JH, Ku CC: Association of pocket epithelial cell proliferation in periodontitis with TLR9 expression and inflammatory response. *J Formosan Med Assoc* 2012; doi:10.1016/j.jfma.2012.07.043.
9. Klonowska-Szymczyk A, Wolska A, Robak R: TLR function in autoimmunological processes. *Post Hig Med Dosw* 2009; 63: 331-339.
10. Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ: Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 2010; 81: 1488-1496.
11. Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ: Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 145-151.
12. Yamaguchi R, Yoshimura A, Yoshioka H, Kaneko T, Hara Y: Ability of supragingival plaque to induce toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontol* 2009; 80: 512-520.

13. Kumar H, Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 621-625.
14. Page RC, Eke PI: Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78: 1387-1399.
15. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chong-Pyong C, Flemming T, et al.: Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodont* 1999; 4: 38.
16. Lang N, Bartold MP, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al.: Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodont* 1999; 4: 53.
17. Offenbacher S, Barros SP, Beck JD: Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol* 2008; 79: 1577-1584.
18. O'Leary TJ, Drake RB, Naylor JE: The plaque control record. *J Periodontol* 1972; 43; 38.
19. Lange DE, Plegmann HC, Eenboom A, Promsberger A: Klinische Bewertungsverfahren zur Objektivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnarztl Z* 1977; 32: 44-47.
20. Ainamo J, Bay I: Problems and proposal for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975; 25: 229-235.
21. Newbrun E: Indices to measure gingival bleeding. *J Periodontol* 1996; 67: 555-561.
22. Sarah SM, Tamilselvan S, Kamatchiammal S, Suresh R: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in gingivitis and chronic periodontitis. *Indian J Dent Res* 2006; 17: 114-116.
23. Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, et al.: Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 398-402.
24. De Oliveira NFP, Andia DC, Planello AC, Pasetto S, Marques MR, Nociti FH Jr, et al.: TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011; 38: 975-983.
25. Fatemi K, Radvar M, Rezaee A, Arab H, RazaatPanah H, Khiavi HA, et al.: Evaluation of the effects of chronic periodontitis on TLR-2 and TLR-4 gene expression in gingival tissues. *J Mash Dent Sch* 2012; 35: 297-306.
26. Wara-aswapati N, Chayasodom A, Surarit R, Pitiphat W, Boch JA, Nagasawa T, Ishikawa I, Izumi Y: Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2013; 84: 1010-1018.
27. Sanhingur SE, Xia XJ, Voth SC, Yeudall A, Gunsolley JC: Increased nuclei acid receptor expression in chronic periodontitis. *J Periodontol* 2013; 84: e48-e57.
28. De Faria Amormino SA, Araújo TC, Saraiva AM, Gomez RS, Dutra WO, da Costa JE, et al.: Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Hum Immunol* 2013; 74: 1231-1236.
29. Muthukuru M, Jotwani R, Cutler CW: Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infect Immun* 2005; 73: 687-694.
30. Yoshioka H, Yoshimura A, Kaneko T, Golenbock DT, Hara Y: Analysis of the activity to induce toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated stimulation of supragingival plaque. *J Periodontol* 2008; 79: 920-928.

Address: 50-525 Wrocław, ul. Krakowska 26
 Tel.: +4879 5100795
 e-mail: darek.chrzeszczyk@interia.eu

Received: 26th February 2017
 Accepted: 23rd April 2017