

**Maciej Tomczak**

**Ekspresja antygenów naczyń  
krwionośnych dziąsła w przewlekłym  
zapaleniu przyzębia**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. UM dr hab. ANNA SURDACKA

Klinika Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii  
Katedry Stomatologii Zachowawczej i Periodontologii  
Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Katedry i Zakładu: Prof. dr hab. med. Janina Stopa

**Poznań 2011**

## SPIS TREŚCI

SKRÓTY	4
I. WPROWADZENIE	6
II. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	8
1 Budowa i rola żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (ang. <i>high endothelial venules</i> , HEVs)	8
2. Morfogeneza HEV	10
3. Udział HEV w patogenezie chorób ogólnoustrojowych	11
4. HEV a choroby przyzębia	12
5. Charakterystyka wybranych markerów żyłek z wysokim śródbłonkiem (HEV)	13
5.1. Cząsteczka CD34	14
5.2. Cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonka 1 (PECAM-1, CD31)	16
5.3. Endogлина (CD105)	19
5.4. Cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1, CD54)	20
5.5. Laminina	23
5.6. Kolagen typu IV	25
5.7. Naczynio-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF)	26
III. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	31
IV. MATERIAŁ I METODY	32
1. Materiał do badań	32
2. Metody badań	33
2.1. Badanie kliniczne pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)	33
2.2. Pobieranie wycinków dziąsła	34
2.3. Badanie histologiczne preparatów dziąseł barwionych hematoksyliną i eozyną	35
2.4. Technika immunocytochemiczna ABC	36
2.5. Ocena ekspresji markerów	37
2.6. Analiza statystyczna	40
2.7. Zagadnienia etyczne	41
V. WYNIKI	
1. Analiza wybranych danych epidemiologicznych i klinicznych	42
2. Histologiczna ocena naczyń krwionośnych dziąsła badanych grup pacjentów w rutynowym barwieniu hematoksyliną i eozyną	47
3. Immunocytochemiczne wykrywanie markerów naczyń krwionośnych w badanych grupach pacjentów	48
4. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w HEV i w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia	53
5. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów w badanych typach naczyń dziąsła (HEV, typowe naczynia) oraz sumarycznej ekspresji antygenów naczyniowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia	54
6. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych u pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa kontrolna 1, K1)	58

7. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych w HEV u pacjentów z odczynowymi węzłami chłonnymi (grupa kontrolna 2, K2)	60
8. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) w zależności od płci pacjenta	61
9. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i w grupach kontrolnych (K1 i K2)	62
10. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od klinicznego poziomu/utruty przyczepu (CAL) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)	68
11. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od aktywności zapalnej w dziąsłach ( <i>grading</i> ) u pacjentów z CP	70
12. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od postaci choroby (uogólniona vs. zlokalizowana) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia	73
13. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją markerów naczyniowych w badanych grupach pacjentów	76
14. Korelacje pomiędzy ekspresją markerów naczyniowych a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów	84
15. Korelacje pomiędzy ekspresją markerów naczyniowych a aktywnością zmian zapalnych w dziąsłach ( <i>grading</i> )	86
16. Analiza indeksu angiogenetycznego (stosunek ekspresji endogliny/PECAM-1 oraz VEGF/PECAM-1, AR)	88
VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	91
VII. WNIOSKI	108
VIII. STRESZCZENIE	109
IX. SUMMARY	112
X. PIŚMIENNICTWO	115
XI. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA	132

## OBJAŚNIENIA SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE

<b>aa</b>	(ang. <i>amino acids</i> ) - aminokwasy
<b>ABC</b>	(ang. <i>avidin-biotin peroxidase complex</i> ) - kompleks awidyna-biotynyłowana peroksydaza
<b>AR</b>	(ang. <i>angiogenesis ratio</i> ) - wskaźnik angiogenetyczny
<b>API</b>	(ang. <i>aproximal plaque index</i> ) – aproksymalny wskaźnik płytki
<b>bFGF</b>	(ang. <i>basic fibroblast growth factor</i> ) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
<b>BSA</b>	(ang. <i>bovine serum albumin</i> ) - albumina surowicy wołowej
<b>CAL</b>	(ang. <i>clinical attachment level/loss</i> ) - kliniczny poziom/utrata przyczepu
<b>CEJ</b>	(ang. <i>cement-enamel junction</i> ) - połączenie szkliwno-cementowe
<b>CD</b>	(ang. <i>clusters of differentiation, cluster determinants</i> ) - kompleks różnicowania, struktury powierzchniowe komórek, głównie limfocytów
<b>CP</b>	(ang. <i>chronic periodontitis</i> ) - przewlekłe zapalenie przyzębia
<b>DAB</b>	(ang. <i>3,3'-diaminobenzidine</i> ) - 3,3'-diaminobenzydyna
<b>DARC</b>	(ang. <i>Duffy antigen/chemokine receptor</i> ) – antygen „Duffy“/receptor chemokin
<b>ELAM-1</b>	(ang. <i>endothelial leukocyte adhesion molecule</i> ) – cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłónka
<b>GCF</b>	(ang. <i>gingivocrevicular fluid</i> ) - płyn dziąsłowy
<b>GlyCAM-1</b>	(ang. <i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i> ) – zależna od glikozylacji cząsteczka adhezji komórkowej-1
<b>GM-CSF</b>	(ang. <i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> ) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
<b>HGF</b>	(ang. <i>human gingival fibroblast</i> ) - hodowane fibroblasty ludzkiego dziąsła
<b>HIF-1</b>	(ang. <i>hypoxia-inducible factor-1</i> ) – czynnik indukowany niedotlenieniem -1
<b>HUVEC</b>	(ang. <i>human umbilical vein endothelial cells</i> ) – komórki śródbłónka ludzkich żylnych naczyń pępowinowych
<b>HVN</b>	(ang. <i>hevin</i> ) – hevina

<b>ICAM-1</b>	(ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i> ) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1
<b>IL</b>	(ang. <i>interleukin</i> ) - interleukina
<b>MAdCAM-1</b>	(ang. <i>mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i> ) - cząsteczka adhezyjna błon śluzowych-1
<b>NF-HEV</b>	(ang. <i>nuclear factor from high endothelial venules</i> ) – czynnik jądrowy charakterystyczny dla żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem
<b>NK</b>	(ang. <i>natural killers</i> ) - naturalne komórki cytotoksyczne
<b>PBS</b>	(ang. <i>phosphate buffered saline</i> ) - sól fizjologiczna buforowana fosforanami
<b>PD</b>	(ang. <i>probing depth</i> ) - głębokość sondowania
<b>PECAM-1</b>	(ang. <i>platelet-endothelial cell adhesion molecule-1</i> ) - cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonka - 1
<b>PHELV</b>	(ang. <i>periodontal high endothelial like venules</i> ) – periodontalne żyłki podobne do HEV
<b>PNAd</b>	(ang. <i>peripheral lymph node addressin</i> ) – adresyna obwodowych węzłów chłonnych
<b>SD</b>	(ang. <i>standard deviation</i> ) – odchylenie standardowe
<b>SEM</b>	(ang. <i>standard error of the mean</i> ) – błąd standardowy średniej
<b>TGF</b>	(ang. <i>transforming growth factor</i> ) - transformujący czynnik wzrostu
<b>TNF</b>	(ang. <i>tumor necrosis factor</i> ) - czynnik martwicy nowotworów
<b>TSP-1</b>	(ang. <i>trombospondin-1</i> ) – trombospondyna-1
<b>VCAM-1</b>	(ang. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> ) - cząsteczka adhezji komórkowej naczyń
<b>VEGF</b>	(ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> ) – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

## I. Wprowadzenie

Zapalenie dziąseł i przyzębia jest schorzeniem szeroko rozpowszechnionym wśród populacji ludzkiej. Pod względem częstości występowania choroby przyzębia plasują się na drugim miejscu wśród chorób jamy ustnej, ustępując pola jedynie próchnicy. Szacuje się, że na świecie w różnych populacjach 1-5% osób cierpi na zapalenie agresywne, a 80% na przewlekłe zapalenie przyzębia, co pozwala zaliczyć *periodontitis* do chorób społecznych [200, 214]. Przewlekłe zapalenie przyzębia (ang. *chronic periodontitis*, CP) jest chorobą o dość dobrze poznanej etiologii, a badania ostatnich lat pozwoliły zidentyfikować czynniki ryzyka rozwoju tej choroby [161]. Zaawansowane uszkodzenie odpowiada głębokiemu zapaleniu przyzębia i charakteryzuje się rozprzestrzenianiem procesu chorobowego na ozębną, kość wyrostka zębodołowego i cement korzeniowy. Występują kieszonki patologiczne wyścielone uszkodzonym w znacznym stopniu nabłonkiem oraz znaczne ubytki kości zębodołu. Należy dodać, że zaawansowane uszkodzenie jest zapaleniem przewlekłym i jako takie ulega zaostrzeniom [197, 198].

Najważniejszym czynnikiem etiologicznym CP są bakterie (i prawdopodobnie także wirusy), a postęp i nasilenie choroby są ściśle uwarunkowane reakcją immunologiczną organizmu na te antygeny. Zróżnicowana odpowiedź gospodarza na patogeny, warunkująca przebieg choroby, zależna jest od uwarunkowań genetycznych i środowiskowych [130, 138, 161, 167].

Ilościowe i jakościowe zmiany naczyń krwionośnych dziąsła towarzyszące zapaleniu przyzębia opisano zarówno na modelu zwierzęcym [74, 93], jak i u człowieka [22, 28]. Porównywano zmiany dotyczące liczby naczyń krwionośnych w *gingivitis* [18], leczonym [22] oraz nieleczonym zaawansowanym przewlekłym zapaleniu przyzębia [28]. Wykazano, że w odpowiedzi na eksperymentalnie wytworzoną płytkę nazębną u młodych zdrowych ludzi około 3-krotnie zwiększa się liczba naczyń krwionośnych dziąsła w ciągu 1 miesiąca, a powraca do normy po jej usunięciu i wdrożeniu higieny jamy ustnej [18]. Rozplem naczyń krwionośnych dziąsła koreluje z zaawansowaniem CP i progresją zapalenia, stąd CP uznaje się także za jedną z chorób wazoproliferacyjnych [147, 198, 218-220]. Proliferacja naczyń miałyby sprzyjać wytwarzaniu okołonaczyniowego materiału hialinowego, hamującego migrację granulocytów obojętnochłonnych (pełniących rolę protekcyjną w chorobach przyzębia) przez ścianę mikronaczyń [146, 217, 219].

W przewlekłym zapaleniu przyzębia wykazano również, że ilościowym zmianom naczyniowym towarzyszą zmiany jakościowe, polegające m.in. na poszerzeniu błony podstawnej włósniczek i żyłek [28, 146, 217] i pojawianiu się żyłek pozawłósniczkowych z

wysokim śródbłonkiem (ang. *high endothelial venules*, HEV) podobnych do HEV znajdujących się fizjologicznie w narządach limfatycznych [119, 146, 204, 218]. Wnioskowano, że żyłki z wysokim śródbłonkiem mogą prezentować miejsca migracji i recyrkulacji leukocytów w zapalnie zmienionych tkankach przyzębia. Nie obserwowano takich naczyń krwionośnych w zdrowych dziąsłach [204]. Badania morfometryczne wykazały zwiększanie się głównie liczby naczyń krwionośnych o średnicy  $\geq 25 \mu\text{m}$  w *lamina propria*, obecnych w najbliższym otoczeniu nabłonka kieszonki przyzębnej [28]. Jak obecnie wiadomo HEV są wyspecjalizowaną odmianą żyłek pozawłosowatych, naczyń o średnicy od 20 do 100  $\mu\text{m}$  z charakterystycznymi komórkami wysokiego śródbłonka (ang. *high endothelial cells*, HEC). Komórki HEC posiadają unikalną budowę histologiczną, którą opisano szczegółowo już w latach 80-tych XX wieku [53, 54]. Są przykładem jednego z najbardziej wyspecjalizowanych śródbłonek naczyń krwionośnych [60, 167, 180, 200]. Żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem uczestniczą w regulowaniu wazomotoryki, hemostazy, angiogenezy, regulują procesy zapalne, ale najważniejszą fizjologiczną funkcją wydaje się być udział w rekrutacji, migracji i recyrkulacji limfocytów z krwi do narządów limfatycznych oraz inicjowanie odpowiedzi immunologicznej po kontakcie z antygenem [60, 167, 199, 201, 218]. W narządach pozalimfatycznych, HEV biorą udział w adhezji i migracji wszystkich typów leukocytów [63, 180].

## II. Przegląd piśmiennictwa

### 1. Budowa i rola żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (ang. *high endothelial venules, HEVs*)

Korzenie badań nad żyłkami pozawłosowatymi z wysokim śródbłonkiem sięgają roku 1898, kiedy to opisane zostały po raz pierwszy przez Thome na modelu zwierzęcym [55]. Już wtedy wiązano ich funkcję z migracją limfocytów w ustroju ze względu na obecność tych komórek w świetle naczyń. W 1964 roku na modelu szczurzym Gowans i wsp. odkryli, że przechodzenie limfocytów z krwioobiegu do węzłów chłonnych ma miejsce w naczyniach HEV zlokalizowanych parakortykalnie w węzłach chłonnych [55, 180]. Naczynia typu HEV odróżniają się od innych naczyń tak pod względem morfologicznym, jak i obecności markerów cytochemicznych [181]. W 1980 roku Andrews i wsp. wykazali związek pomiędzy funkcją a charakterystycznym, „pulchnym” (ang. *puffy*) wyglądem komórek wysokiego śródbłonka [4].

Komórki śródbłonka wyściełające wewnętrzną powierzchnię naczyń HEV znacząco różnią się od typowych komórek śródbłonka płaskiego. Najbardziej widoczną cechą morfologiczną HEV jest właśnie kształt - sześcienny lub cylindryczny, z wyraźnymi, choć nieciągłymi połączeniami międzykomórkowymi i jasną (ang. *ground glass*) cytoplazmą [53, 55, 60, 167, 199]. Budowa histologiczna komórek wysokiego śródbłonka świadczy o ich wysokiej aktywności, a różnice ich budowy w stosunku do komórek płaskiego śródbłonka zaobserwować można już w rutynowych barwieniach histologicznych [53, 55, 87]. Komórki HEC posiadają duże, nieregularne jądro z rozproszoną chromatyną i centralnie umieszczonym jąderkiem [42]. W pobliżu jądra usytuowany jest rozbudowany aparat Golgiego [89]. Bogata w mikrofilamenty jasna cytoplazma wypełniona jest licznymi mitochondriami, które charakteryzują się różną wielkością i kształtem. Równie obfita jest szorstka siateczka śródplazmatyczna [53, 55]. Bardzo liczne są polirybosomy [60]. Znaczna liczba ciałek Weibela-Palade'a oraz innych struktur pęcherzykowych o wysokiej gęstości świadczy o wysokim potencjale sekrecyjnym HEC [60]. Część wolna błony komórkowej HEC wykazuje nieregularność. Tworzy liczne mikrokosmki i zagłębienia, które zwiększając powierzchnię kontaktu, podnoszą zdolność wyłapywania limfocytów [180]. Część tę pokrywa gruby glikokaliks [55, 60]. Podobne nieregularności o charakterze głębokich zagłębień przejawia powierzchnia podstawna błony komórkowej [3]. Ścisłe połączenia międzykomórkowe w śródbłonku HEV są słabo rozwinięte, a mała ich liczba koreluje z wąskimi szczelinami, które występują pomiędzy komórkami [55]. Powierzchnia wolna HEV prezentuje bogatą ekspresję ligandów zaliczanych do grupy adresyn (ang. *peripheral node*



*addressin*, PNAd). Ekspresja ta jest 5-30 razy większa niż na śródbłonku naczyń włosowatych o ścianie ciągłej. Tak duża ilość adresyn jest fundamentalna podczas kaskady adhezyjnej w aktywacji i przechodzeniu limfocytów poza przedział naczyniowy [77, 89]. Błona podstawna HEC jest dobrze rozwinięta i nie stanowi warstwy o stałej grubości, ale tworzy luźny układ wielowarstwowy, zazwyczaj nieregularny [3]. Typowa dla HEC „pulchna” morfologia indukowana jest białkami: hewiną (ang. *hevin*, HVN) i trombospondyną-1 (ang. *trombospondin-1*, TSP-1), co potwierdzone zostało badaniami *in vitro* [61, 120].

W świetle żyłek z wysokim śródbłonkiem obecna jest znacząco większa liczba krwinek białych niż czerwonych. Cechą charakterystyczną HEV jest także, opisywana już przez Thome, obecność dużej liczby małych, dojrzałych limfocytów zarówno wewnątrz, jak i w sąsiedztwie naczynia [53]. Wokół HEV limfocyty tworzą charakterystyczne koncentryczne okręgi [203]. Należy dodać, że przez HEV obwodowych narządów limfatycznych migrują głównie limfocyty T i B, a przez żyłki pozawłosowate narządów Nielimfatycznych mogą przejść wszystkie rodzaje leukocytów [60, 63].

Żyłki pozawłosowate o wysokim śródbłonku występują we wszystkich obwodowych narządach limfatycznych takich jak: węzły chłonne, migdałki, kępki Peyera w jelicie cienkim, wyrostek robaczkowy oraz w małych skupiskach tkanki limfatycznej żołądka i jelita cienkiego oraz dróg oddechowych [42, 56, 60, 180]. HEV nie występują w śledzionie [42, 167]. Pojedyncze HEV obserwowano w rdzeniu grasicy [42].

HEV mogą pojawić się także poza narządami limfatycznymi, jak ma to miejsce w przypadku tkanek miękkich przyzębia objętym przewlekłym procesem zapalnym. Naczynia te, dla odróżnienia od HEV z narządów limfatycznych, nazywane są przez niektórych autorów żyłkami podobnymi do HEV (ang. *HEV-like venules* lub *periodontal high endothelial venules*, PHELV) [53]. Obecne są zwłaszcza w okolicach znacznej akumulacji limfocytów w blaszce właściwej błony śluzowej (*lamina propria mucosae*) [42, 53, 82].

Żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem służą przede wszystkim obronie organizmu przed patogenami [78, 203]. Główną fizjologiczną funkcją HEV jest ich udział w migracji i recyrkulacji limfocytów (T i B) w narządach limfatycznych. Służy to wczesnemu rozpoznaniu antygenów (także antygenów drobnoustrojów) prezentowanych na dojrzałych komórkach dendrytycznych i inicjacji odpowiedzi immunologicznej poprzez wytworzenie komórek efektorowych i komórek pamięci [46, 63, 166]. Na skutek kaskady zdarzeń, w których biorą udział prezentowane przez HEC ligandy, dochodzi do diapedezy - procesu przechodzenia limfocytów poza przedział naczyniowy. Wstępem do ścisłej adhezji i

przechodzenia limfocytów przez ścianę naczynia pozawłosowatego jest ich „rozpoznanie” i powolne „toczenie się” (ang. *rolling*) po ścianie komórek śródbłónka. W etapie rozpoznawania różnych populacji limfocytów przez HEV dowiedziono roli chemokiny SLC (ang. *secondary lymphoid-tissue chemokine*, SLC), która jest pierwszą opisaną chemokiną z powinowactwem do tzw. naiwnych limfocytów T oraz pośredniczy w zasiedlaniu wtórnych narządów limfatycznych przez te komórki [63, 66, 196]. Obecność SLC na HEV w kępkach Peyera oraz odpowiedniego receptora dla SLC, tzw. CCR7 (ang. *CC chemokine receptor 7*) na limfocytach była krytycznym etapem rozpoznawania limfocytów T, a nie limfocytów B [196]. Istotną rolę w tym procesie pełnią cząsteczki adhezyjne i to zarówno te obecne na powierzchni limfocytów (tzw. receptory zasiedlania), jak i na powierzchni HEV (adresyny naczyniowe) [63, 98]. Do grupy pierwszej zaliczamy m. in. L-selektyny, do drugiej – kompleks glikoproteinowych ligandów z grupy adresyn naczyniowych (PNAd) [151, 186]. Wśród adresyn wymienia się m.in. cząsteczkę GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1, białko podocalyxin i endomucynę [85, 154, 155, 176]. Do niedawno wykrytych sialomucyn z grupy adresyn należy także nepmucyna obecna na mikrokosmowatych wypustkach HEC węzłów chłonnych, nieobecna w HEC kępek Peyera. Ma ona ułatwiać zarówno etap „toczenia się” po ścianie HEC, jak i ścisłego przylegania limfocytów do ściany naczynia [186]. Ruchliwość limfocytów i ich migrację między komórkami śródbłónka ułatwia także glikoproteina anty-adhezyjna nazwana hewiną. Została wykryta w ludzkich HEV z narządów limfatycznych [61]. Wymienione białka, produkowane w dużej ilości przez komórki HEC, określane są markerami immunocytochemicznymi naczyń typu HEV. Badania Liao i Ruddle (2006) potwierdziły wcześniejsze obserwacje, że do prawidłowej funkcji HEV i tzw. plastyczności oraz remodelowania tych naczyń wymagana jest obecność prawidłowych naczyń limfatycznych w węzłach chłonnych [104]. W procesie przechodzenia komórek przez śródbłonek HEV, oprócz cząsteczek adhezyjnych uczestniczą również odpowiednie enzymy [63, 98]. Najwięcej prac dotyczy fukozylotransferaz (FucT-IV, FucT-VII) oraz sulfotransferazy zwanej HEC-GlcNAc6ST, które pełnią również funkcję ligandów dla L-selektyny [20, 73, 107, 151]. Dowiedziono udziału metaloproteinaz, o właściwościach endopeptydaz w pokonywaniu struktur błony podstawnej HEV i migracji limfocytów poprzez komórki śródbłónka [46].

## **2. Morfogeneza HEV**

Jak dotąd skąpe są informacje na temat mechanizmów formowania się HEV w tkankach limfatycznych i miejscach przewlekłego zapalenia [60, 179]. Żyłki pozawłosowate różnicują

się prawdopodobnie z prymitywnych naczyń włosowatych w odpowiedzi na stały, powolny i o niskim ciśnieniu prąd krwi [179]. Komórki wysokiego śródbłonka mogą być oddzielną ontogenetycznie linią komórek lub indukowanym czynnikiem miejscowymi, odwracalnym fenotypem płaskiego śródbłonka. Nie wykluczając pierwszej hipotezy, badacze przychylają się do możliwości oddziaływania mikrośrodowiska tkanek na zmiany fenotypu HEC [42, 56, 60, 102]. Sugeruje się udział czynnika jądrowego charakterystycznego dla HEV (ang. *nuclear factor from HEVs*, NF-HEV) w regulacji wyspecjalizowanego fenotypu tych naczyń żylnych [9]. Ponadto Hendriks i Eesterman udowodnili, że w węzłach chłonnych pozbawionych dopływu chłonki, HEV mogą zmienić się w wysłane płaskim śródbłonkiem żyłki pozawłosowate, które nie są zdolne do wylapywania limfocytów [71]. Inni autorzy wykazali szybką i uderzającą utratę cech charakterystycznych dla ludzkich HEV po izolacji tych naczyń z narządów limfatycznych i pozbawieniu ich normalnego dla nich mikrośrodowiska. Wykazano wówczas całkowity brak co najmniej dwóch markerów HEV: DARC oraz HEV-specyficznej fukozylotransferazy Fuc-TVII, a także obniżoną ekspresję wielu innych genów [102].

### **3. Udział HEV w patogenezie chorób ogólnoustrojowych**

Żyłki pozawłosowate wyścielone komórkami wysokiego śródbłonka obserwowano w licznych procesach patologicznych (przewlekłe zapalenia, zmiany nowotworowe) [53, 119]. Wykazywano je w takich jednostkach chorobowych, jak: zapalenie stawów, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Crohna, zapalenie tarczycy typu Hashimoto oraz zapaleniach przyzębia [28, 53, 54, 82, 136, 219, 220]. Charakterystyczną cechą tkanek objętych przewlekłym procesem zapalnym jest właśnie rozplem HEV, których śródbłonek wykazuje wysoki poziom metaboliczny [60, 167]. Liczba HEV wzrasta w obszarach ze zwiększoną liczbą komórek nacieków zapalnych [52]. Skład komórkowy tych nacieków stanowią głównie limfocyty i to zarówno limfocyty T [66, 196], jak i limfocyty B [82]. Pod wpływem lokalnej odpowiedzi immunologicznej lub w utrwalonym przewlekłym stanie zapalnym, „zwykłe” żyłki pozawłosowate mogą przekształcić się w HEV, aby pełnić rolę w regulacji przechodzenia leukocytów do tkanek zapalnie zmienionych [42, 110, 167, 199]. Pod względem budowy histologicznej HEV w dziąsłach z przewlekłym zapaleniem są identyczne z naczyniami występującymi w narządach limfatycznych [203]. Badaniami prowadzonymi w warunkach *in vitro* na materiale uzyskanym od pacjentów ze schorzeniami, takimi jak: wrzody żołądka i dwunastnicy, choroba reumatyczna, autoimmunologiczne zapalenie tarczycy, zapalenie wielomięśniowe, czy odmiedniczkowe zapalenie nerek

wykazano adhezję limfocytów do komórek wysokiego śródbłonka [54]. Należy przypomnieć, że poprzez ścianę naczyń HEV o lokalizacji pozalimfatycznej, mogą przechodzić także inne leukocyty (neutrofile, monocyty, eozynofile), których napływ do tkanek intensywnie wzrasta w stanie zapalnym, inicjowany sekrecją cytokin prozapalnych: IL-1, czynnika martwicy nowotworów (ang. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) i/lub chemokin przez makrofagi [63].

Zmiany w mikrounaczynieniu tkanek w przebiegu zapalenia odgrywają istotną rolę w miejscowej odpowiedzi układu immunologicznego, takiej jak: prezentacja antygeny, aktywacja limfocytów T oraz ekspresja antygenów zgodności tkankowej typu I i II [81, 112, 167]. Potwierdzeniem są wyniki badań, które wykazały obecność komórek wysokiego śródbłonka pełniących funkcję monocytów i makrofagów [112]. Wykazano, że HEC mogą także produkować cytokiny, takie jak: IL-1 oraz czynnik stymulujący powstawanie kolonii (ang. *colony-stimulating factor*, CSF), które także uczestniczą w procesach odpornościowych organizmu [112, 156, 220]. Na HEC węzłów chłonnych wykazano ekspresję liganda Fas (Fas-L), cząsteczki która ma regulować przechodzenie leukocytów przez ścianę naczynia krwionośnego [95].

#### **4. HEV a choroby przyzębia**

Zapalnie zmienione tkanki dziąsła charakteryzują się naciekiem zapalnym złożonym głównie z limfocytów T i B [57, 89, 153, 108, 205], skupiającym się często wokół HEV. Należy zaznaczyć, że w materiale pochodzącym ze zdrowych dziąseł nie stwierdzono obecności typowych HEV [78, 218]. W zapalnie zmienionych dziąsłach oraz przewlekłych zmianach okołowierzchołkowych zęba wielu autorów obserwowało naczynia typu HEV, co pozwoliło wysunąć przypuszczenie, iż istnieje ścisły związek pomiędzy chorobą przyzębia, rozplemem naczyń i obecnością licznych komórek nacieków zapalnych [216, 217]. Proliferacja naczyń pod nabłonkiem łączącym była również istotną cechą choroby przyzębia u szympanów. Obserwowano u nich pętle włóściczkowe z dużą liczbą granulocytów obojętnochłonnych, rozciągnięte niemalże do powierzchni nabłonka kieszonki przyzębnej. Duża liczba neutrofilów znajdowała się w samym nabłonku kieszonki [139]. Badania Pinchback i wsp. (1996) wykazały, że dostarczane z płytki nazębnej substancje miały łatwy dostęp do tkanki łącznej i systemu naczyniowego. Obserwowano nagromadzenie komórek limfoidalnych, zanik włókien kolagenowych, rozplem luźnej tkanki łącznej i proliferację włóściczek [146].

U pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (ang. *chronic periodontitis*, CP) obserwuje się zaburzenia odpowiedzi immunologicznej wskutek zmienionej funkcji neutrofilów, monocytów, limfocytów i fibroblastów [157]. Sama ekspansja naczyń poprzez zwiększenie średnicy światła naczynia, krętości jego przebiegu, a także poprzez pojawienie się HEV wydaje się chronić tkanki przyzębia przed zapaleniem. Z drugiej jednakże strony wtórne zmiany struktury naczyń, ich udział w produkcji cytokin, właściwości żerne HEC pozwalają sądzić, że zmiany te mogą przyczyniać się do progresji zmian w przyzębiu [23, 28, 87, 194]. Sam rozplem naczyń oraz zmiana fenotypu komórek śródbłonna pozwala zaliczyć przewlekłe zapalenia przyzębia do chorób wazoproliferacyjnych [147].

Pojawianie się HEV w tkankach jamy ustnej może zależeć od kilku czynników, m. in. od nasilonej syntezy naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), który działa proangiogenicznie i zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych. Prawdopodobnie odpowiada on za krwawienie i obrzęk tkanki [80, 112]. W dalszym etapie komórki śródbłonna powstające *de novo* rozpoczynają produkcję cytokin, czynników adhezyjnych dla limfocytów oraz innych substancji promujących rozwój zapalenia, przyczyniając się do pojawienia nowych populacji limfocytów w ognisku zapalnym. Monocyty i makrofagi także uczestniczą w procesie angiogenezy dzięki zdolności do wytwarzania czynników odpowiedzialnych za ten proces [80, 112]. Wytwarzane przez śródbłonek czynniki wzrostowe, takie jak wspomniany VEGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*, bFGF), cytokiny i chemoatraktanty nasilają angiogenezę oraz zwiększają migrację komórek prozapalnych [28, 218, 220].

Komórki wysokiego śródbłonna biorą udział w opóźnionym typie odpowiedzi immunologicznej. Według niektórych autorów profil immunologiczny i zmiany histopatologiczne tkanek okołowierzchołkowych zęba są podobne do reakcji opóźnionej odpowiedzi immunologicznej występującej w skórze [158, 204]. Ponadto w zaawansowanych stanach zapalnych dziąseł obserwowano odkładanie składników błony podstawnej (laminina, kolagen typu IV) dookoła naczyń żylnych [146]. Mogło to przyczyniać się do progresji zapalenia przyzębia poprzez osłabienie migracji granulocytów obojętnochłonnych (protekcyjnych w chorobach przyzębia) z naczyń do tkanek [217, 219].

## **5. Charakterystyka wybranych markerów żyłek z wysokim śródbłonkiem (HEV)**

Obok spotykanych w literaturze opisów morfologii i funkcji HEC, znaleźć można ciekawe wyniki badań dotyczących poszukiwania specyficznych markerów tych komórek. I tak na

modelu szczurzym Andrews i wsp. (1982) zwrócili uwagę, iż komórki HEC charakteryzowały się wychwytywaniem dużych ilości  $SO_4$ , który będąc substratem dla cząsteczki o dużej zawartości siarki (prawdopodobnie glikolipidu), odgrywał znaczącą rolę w procesie przechodzenia limfocytów poza przedział naczyń [4]. Obserwacje te poparli także inni autorzy [55, 59, 89, 218]. Wychwytywanie  $SO_4$  uważano więc za relatywnie specyficzne dla HEV, obserwowane jednakże tylko w badaniach *in vitro* i z zastosowaniem metod autoradiograficznych. Dalsze wyniki badań wskazują na obecność histochemicznych markerów HEV, takich jak m.in. niespecyficzna esteraza i anhydraza węglanowa [42]. Komórki wysokiego śródbłonka żyłek pozawłosowatych wytwarzają także duże ilości białek markerowych, wykrywanych z zastosowaniem metod immunocytochemicznych [13, 17, 41, 72, 77, 103, 121, 149, 202].

W pracy przedstawione zostaną szczegółowo te markery HEV, które odgrywają najważniejszą rolę podczas kaskady adhezyjnej i wędrówki leukocytów do lokalnych miejsc zapalenia w odpowiedzi na antygen bakteryjny i/lub wirusowy.

### 5.1. Cząsteczka CD34

Cząsteczka (zwana dawniej antygenem) CD34 jest jednołańcuchową, transbłonową glikoproteiną zaliczaną do rodziny sialomucyn. Jest jedną z tzw. adresyn (ang. *peripheral node adressin*, PNA<sub>d</sub>) [180]. To integralne białko błonowe posiada m. cząst. w przedziale od 105 do 120 kDa (forma pełna i skrócona) [16, 151, 160], u myszy od ~ 90 kD do ~ 100 kDa [100]. U człowieka pełna forma CD34 posiada masę cząst. ~ 110 kDa i zawiera 385 aminokwasów [5]. Gen kodujący CD34 znajduje się na chromosomie 1 (1q32) [160].

CD34 ulega ekspresji przede wszystkim w komórkach prekursorowych układu krwiotwórczego i komórkach śródbłonka małych naczyń krwionośnych w narządach prawidłowych oraz w nowotworach wywodzących się z komórek śródbłonka [100, 141], co potwierdzono detekcją mRNA CD34 [5, 38]. CD34 nie występuje natomiast na śródbłonnkach dużych naczyń i łożyska [141].

Śródbłonkowy antygen CD34 pierwotnie oznaczano jako białko Sgp90 o m. cząst. ~ 90 kDa [13]. Wykryto następnie, iż w komórkach śródbłonka ekspresja cząsteczki jest zawsze utrzymywana na wysokim poziomie na powierzchni zwróconej do światła naczynia, a powierzchnie bazolateralne komórek charakteryzują się ekspresją niskiego stopnia [12, 93]. Ciekawostką jest fakt, iż CD34 w komórkach progenitorowych szpiku kostnego posiada ekspresję zarówno błonową, jak i cytoplazmatyczną. Hodowane komórki śródbłonka naczyń ludzkiej powinny cechować się rozsianą ekspresją błonową CD34 (częściowo także na

powierzchni mikroosmków) [38]. Uważa się, że antygen CD34 towarzyszy rozwojowi naczyń krwionośnych na każdym etapie, w stanach fizjologicznych i w procesie rekapitulacji angiogenezy w zmianach nowotworowych [5].

Celem pionierskich badań dotyczących antygeny CD34 była analiza ekspresji tej cząsteczki jako antygeny różnicowego ludzkich hematopoetycznych i progenitorowych komórek macierzystych. Nadal cząsteczka ta uznawana jest jako najważniejszy pozytywny marker tych komórek [5]. Należy nadmienić, że pojawiło się sporo dowodów na obecność innych komórek CD34-pozytywnych, także wśród komórek ostatecznie zróżnicowanych (m.in. mysie komórki tuczne, ludzkie fibroblasty i fibrocyty) [5, 38].

W odniesieniu do HEV występujących „fizjologicznie” w obwodowych narządach limfatycznych (węzły chłonne, migdałki), ekspresję antygeny CD34 opisywano na powierzchni wolnej komórek śródbłonka (HEC) tego typu naczyń [12, 151, 167].

Dokładna funkcja CD34 nie jest znana, jednak pojawiło się wiele hipotez na ten temat. Na modelu hodowanych komórek śródbłonka żylnych naczyń pępowinowych (ang. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) w latach 90-tych ubiegłego wieku opisano wzajemne korelacje między CD34, wybranymi cytokinami oraz cząsteczkami adhezyjnymi [38]. Obserwowano zmniejszenie ekspresji CD34 i mRNA tego antygeny po podaniu interleukiny 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oraz TNF- $\alpha$ , przy jednoczesnym wzroście ekspresji cząsteczki adhezji leukocytów do śródbłonka (ang. *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1*, ELAM-1, selektyna E) oraz cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1). Wyniki te sugerowały, iż antygen CD34 może negatywnie modulować adhezyjne funkcje śródbłonka naczyń, jego produkcja nie jest konstytutywna i podlega regulacji (np. przez zmiany w środowisku zewnętrznym) [38]. Aktualnie wiadomo, że ekspresja ICAM-1 i selektyny E (ELAM-1) rzeczywiście wzrasta pod wpływem cytokin prozapalnych: IL-1 i TNF- $\alpha$ , a zjawisko to poprzedza formowanie się nacieku zapalnego [63]. Natomiast antygen CD34 okazał się ligandem dla selektyny leukocytarnej (L) (CD62L) (występującej konstytutywnie na powierzchni leukocytów). Domena lektynowa L-selektyny rozpoznaje reszty węglowodanowe (siarczanowane, fukozylowane oraz sialowane) zewnątrzkomórkowego fragmentu CD34.

Uznaje się więc, że CD34 bierze udział w I i II etapie przechodzenia leukocytów przez HEV, tj. fazie toczenia (ang. *rolling*) i aktywacji limfocytów, w których to etapach niezbędne są także selektyny: E (endotelialna) oraz P (płytkowa) [12, 63, 151]. Cząsteczka CD34 pełni istotną rolę w różnych fazach zapalenia i jej ekspresja jest utrzymana w miejscach toczącego się procesu zapalnego.

Rola CD34 na powierzchni innych komórek, np. komórek tłuszczowych wiązana jest ze zwiększeniem ruchliwości tych komórek i bardziej efektywną ich migracją do zainfekowanych tkanek [141]. Spekuluje się udział antygenu CD34 również w dynamice dojrziałych ludzkich fibrocytów [184].

W chorobach przyzębia ekspresję antygenu CD34 wykazywano na proliferujących komórkach śródbłonna naczyniowego dziąseł i/lub komórkach o zmienionym fenotypie (HEC) [28, 219]. Rozplem i przebudowa naczyń skutkuje zwiększeniem liczby komórek śródbłonna, co potwierdziły m. in. badania Mirbod i wsp. (2001) z zastosowaniem immunohistochemicznego wykrywania antygenu CD34 na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych [28, 113]. Aimetti i wsp. (2008) prowadzili badania nad niechirurgicznymi sposobami leczenia przerostów dziąseł po leczeniu Cyklosporyną A. Identyfikowano występowanie CD34 jako markera *endothelium* naczyniowego przed i po leczeniu [1]. Inne podejście do występowania ekspresji CD34 w tkankach dziąsła przedstawił Ohta i wsp. (2008), który za pomocą reakcji immunohistochemicznej, identyfikował występowanie mezenchymalnych i hematopoetycznych komórek prekursorowych pochodzenia szpikowego podczas gojenia ran w obrębie więzadeł ozębnej [133].

## **5.2. Cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1 (PECAM-1, CD31)**

Cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna 1 (ang. *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*, PECAM1, CD31, EndoCAM ) jest glikoproteiną o m. cząst. 130 kDa, zbudowaną z 738 aminokwasów, należąca do typu I transbłonowych cząsteczek adhezyjnych. Należy do nadrodziny immunoglobulin. Gen kodujący CD31 znajduje się na końcu długiego ramienia chromosomu 17. Obecna nazwa antygenu używana jest od 1990 roku. Wcześniej w piśmiennictwie cząsteczka określana była mianem antygenu różnicowania komórek pochodzenia szpikowego (ang. *myelodifferentiation antigen*) [125]. Cząsteczka zbudowana jest z domeny cytoplazmatycznej o charakterze długiego ogona, krótkiej hydrofobowej domeny transbłonowej, a także sześciu zewnątrzkomórkowych domen zbudowanych podobnie jak łańcuchy immunoglobulin [204]. Co najmniej dwie z tych domen posiadają potencjał adhezyjny [126, 127]. Odpowiadają one za kontakt z innymi cząsteczkami, pośredniczą w adhezji, uczestniczą w zapoczątkowaniu kontaktu pomiędzy komórkami śródbłonna i stabilizują jego budowę [40, 126, 127]. W obrębie domeny cytoplazmatycznej znajdują się dwa specjalne motywy ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-*



*based inhibitory motif*) odpowiedzialne za przenoszenie hamującego sygnału w komórce, a także motyw z aktywującą sekwencją ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) [128, 215].

Ekspresja PECAM-1 dotyczy komórek śródbłonna naczyń, monocytów, neutrofilów, niektórych populacji limfocytów T i B, krążących płytek krwi oraz komórek nowotworowych [62, 159, 163]. Wysoki poziom ekspresji występuje na komórkach śródbłonna żylnego, płytkach krwi, granulocytach oraz monocytach [173]. W komórkach śródbłonna ekspresja CD31 jest szczególnie wysoka w bocznych powierzchniach błon, w miejscu występowania połączeń międzykomórkowych. Koncentracja jej dochodzi tam do  $10^6$  cząsteczek, pełniąc wiążącą rolę w procesach zapalnych, immunologicznych, a także związanych z agregacją płytek krwi [127]. Późniejsze badania wykazały jednakże, że CD31 ulega bardziej jednolitej ekspresji na powierzchni śródbłonna naczyń np. mięśnia sercowego. W przypadku *endothelium* HEV ekspresja CD31 dotyczy zarówno części luminalnej komórek (w strukturach pęcherzykowych w pobliżu błony komórkowej), jak i bocznych powierzchni błon komórkowych [180]. Ekspresji PECAM-1 z reguły nie wykazują fibroblasty, komórki nabłonka, a także erytrocyty. Warto nadmienić, że poziom ekspresji na komórkach śródbłonna jest konstytutywny i nie zmienia się ilościowo pod wpływem cytokin [63]. Z klinicznego punktu widzenia szczególne ważne wydaje się powiązanie PECAM-1 z funkcjonowaniem śródbłonna naczyń żylnych [39].

Znajomość mechanizmów molekularnych skutkujących syntetyzowaniem PECAM-1 przez komórki nadal stanowi zagadkę. W stosunkowo bogatym piśmiennictwie opisującym funkcje tej cząsteczki, na pierwszym miejscu stawiany jest jej udział w zjawisku kaskady adhezyjnej, której efektem jest przechodzenie leukocytów poza naczynie HEV do otaczających tkanek [163, 204]. Dowody na udział PECAM-1 w migracji leukocytów *in vitro* dostarczyli na podstawie swoich badań Muller i wsp. (1993), a także Bogen i wsp. (1994) [22, 118]. PECAM-1 bierze udział w fazie III i IV, a więc etapie ścisłej adhezji oraz diapedezy (transmigracji) leukocytów przez ścianę naczynia, co wykazały badania czynnościowe [118]. Pierwsze doniesienia o adhezyjnych właściwościach cząsteczki pochodzą z 1991 roku z badań Albeldy i wsp. [2], a dane o udziale PECAM-1 w przezśródbłonkowej wędrówce leukocytów dostarczył w 1993 roku Muller i wsp. [118]. Obserwacje te potwierdził w tym samym roku Vaporciyan i wsp. na podstawie badań nad wędrówką neutrofilów na modelu zwierzęcym [192]. Bogen (1994) na modelu mysim wykazał, iż przeciwciała przeciwko PECAM-1 wstrzyknięte na 4 godziny przed wywołaniem ostrej reakcji zapalnej zablokowały migracje leukocytów do miejsca zapalenia nawet na 48 godzin, a blokada ta w największym stopniu dotyczyła neutrofilów [21].

Sugerowano udział PECAM-1 w pasażu monocytów poprzez błonę podstawną śródbłonka dzięki interakcjom cząsteczki ze składnikami macierzy pozakomórkowej. Mniejszą rolę ma odgrywać natomiast w podobnym transporcie dotyczącym limfocytów, gdyż inaktywacja genu dla CD31 nie zaburzała pasażu leukocytów w węzłach chłonnych [43]. Podkreślaną w piśmiennictwie rolę PECAM-1 jest także udział tej cząsteczki w waskulogenezie [26, 168].

Mechanizm regulacji funkcji PECAM-1 jest złożony. Regulacja interakcji międzykomórkowych z udziałem cząsteczki PECAM-1 odbywa się m.in. za pomocą zmian poziomu ekspresji na błonie komórkowej, a także zmian zachodzących zarówno w obrębie domeny cytoplazmatycznej jak i domen zewnątrzkomórkowych. Dodatkowo funkcje adhezyjne domen zewnątrzkomórkowych mogą być regulowane przez domenę cytoplazmatyczną. Zwiększenie poziomu ekspresji cząsteczki zmienia mechanizm wiązania z heterofilnego na homofilny [163]. Komórki śródbłonka HEV pozbawione cząsteczki nie tworzyły między sobą ścisłych połączeń oraz nie miały typowej, sześcienniej budowy [40]. Wykazano także, iż cytoplazmatyczna domena PECAM-1 odgrywa rolę w rozwoju układu sercowo-naczyniowego [163]. Już badania De Lisser'a i wsp. (1994) oraz Yan'a i wsp. (1995) dowiodły, iż modyfikacje cytoplazmatycznej domeny cząsteczki mogą wpływać na jej właściwości adhezyjne i wiązanie z odpowiednimi ligandami [39, 206]. Charakteryzując funkcje PECAM-1 warto wspomnieć o jej udziale w apoptozie oraz przekazywaniu sygnałów w komórce [215]. Istnieją dowody na udział cząsteczki w przenoszeniu sygnału hamującego programowaną śmierć komórki [128]. Mechanizm cytoprotekcyjnego działania PECAM-1 nie jest znany, prawdopodobnie dochodzi do wiązania z różnymi enzymami, jak kinazy i fosfatazy. Zakłada się udział tego białka w regulacji transkrypcji i funkcji białek apoptotycznych [215]. Komórki nowotworowe wydają się także wykorzystywać działanie antyapoptotyczne i proangiogenne CD31 do swojego przetrwania [97, 175]. Z kolei badanie mechanizmów działania cząsteczki w transporcie przez komórki śródbłonka, dowodzi jej udziału w regulacji drogi sygnałowej z udziałem jonów  $Ca^{+2}$ . Aktywowanie kanałów wapniowych ma odgrywać rolę w transmigracji neutrofilów [132].

Mimo szeroko zakrojonych badań funkcja PECAM-1 nie została do końca wyjaśniona. Dalsze badania nad tą cząsteczką mogą zaowocować wynalezieniem terapii znoszącej niepowołane reakcje zapalne i inne stany patologiczne [117]. Już dziś powiązane PECAM-1 z procesami trombogenezy, zapalenia, apoptozy oraz odpowiedzi immunologicznej są niezaprzeczalne, a dalszy postęp badań nad molekularnymi właściwościami PECAM-1 pozwoli rzucić nowe światło na jej rolę w biologii komórki.

Biorąc pod uwagę, że choroba przyzębia jest odpowiedzią silnie unaczynionej tkanki na czynniki infekcyjne, jasny wydaje się fakt zwiększonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych dla leukocytów na komórkach śródbłonna naczyniowego [210]. PECAM-1 jest jedną z cząsteczek adhezyjnych osiągających najwyższą ekspresję w komórkach śródbłonna naczyniowego, a jej ilość dochodzi do prawie miliona cząsteczek w komórce [210]. Tak wysokie stężenie pełni kluczową rolę w adhezji pomiędzy komórkami śródbłonna oraz w interakcjach tych komórek z leukocytami [210]. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono pojedyncze prace dotyczące badań nad funkcją PECAM-1 w schorzeniach przyzębia [58, 178, 210]. Gemell i wsp. (1994) badali ekspresję cząsteczek adhezyjnych, w tym PECAM-1 na różnych populacjach komórek dziąsła (limfocyty, komórki śródbłonna, keratynocyty) u pacjentów z *gingivitis* i *periodontitis*. Wykazali, że ekspresja CD31 na limfocytach była podobna w obu jednostkach chorobowych. Pozytywną reakcję immunocytochemiczną obserwowali również na komórkach śródbłonna naczyń [58]. Badania Taşman'a i wsp. (1999) dotyczące ekspresji cząsteczek adhezyjnych w naczyniach krwionośnych miazgi zębów u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, nie ujawniły istotnych różnic w nasileniu ekspresji PECAM-1 pomiędzy grupą CP a kontrolą [178]. Z kolei w badaniach na hodowanych komórkach HUVECs, Yun i wsp. (2005) wykazali zmniejszenie ekspresji PECAM-1 na bocznych powierzchniach komórek śródbłonna po podaniu aktywnych gingipain (proteinaz cysteinowych) wytwarzanych przez *Porphyromonas gingivalis*. Towarzyszyła temu zwiększona przepuszczalność pojedynczej warstwy komórek śródbłonna dla albuminy i neutrofilów [210].

### **5.3. Endoglina (CD105)**

Endoglina (ang. *endoglin*) jest integralną, transbłonową glikoproteiną typu I, występującą na powierzchni komórek śródbłonna jako homodimer o masie cząst. około 180 kDa [30]. Opisywana jest jako białko markerowe aktywnych, proliferujących komórek śródbłonna kapilar, tętniczek oraz żyłek. Białko to uznaje się więc za znaczący marker neoangiogenezy. Cząsteczka składa się z 561 aminokwasowej domeny zewnątrzkomórkowej, 25 aa hydrofobowej domeny transbłonowej, oraz 47 aa ogona wewnątrzkomórkowego stanowiącego domenę cytoplazmatyczną [65]. Ludzki gen kodujący endoglinę znajduje się na chromosomie 9 (9q34) [47]. Należy dodać, że w warunkach fizjologicznych ekspresja CD105 jest niewielka, a w patologii występuje w formujących się komórkach śródbłonna w obrębie tkanek zmienionych zapalnie, nowotworowo i/lub regenerujących się [25, 37, 183, 190]. Jej ekspresję wykazano także (w małych ilościach) w komórkach progenitorowych

układu krwiotwórczego, komórkach mięśniowych gładkich, fibroblastach i makrofagach [19]. Ekspresję tego białka znacznie zwiększa hipoksja tkanek poprzez indukcję syntezy czynnika HIF-1 (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1*), który z kolei jest silnym stymulatorem syntezy VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*). Mutacje i brak ekspresji endogliny wykazano w niektórych chorobach, związanych z zaburzoną waskulogenezą, m. in. w dziedzicznej krwotocznej teleangiektazji i zmianach po zawale mięśnia sercowego [11, 190].

Pozytywną ekspresję markerów charakterystycznych dla HEC (w tym endogliny) wykazano w hodowanych komórkach śródbłonna pochodzących z mysich węzłów chłonnych [35]. Ekspresję genu *endogliny* w mysich komórkach wysokiego śródbłonna (HEC) naczyń w węzłach chłonnych wykazał po raz pierwszy Izawa i wsp. (1999). Była ona silniejsza w porównaniu z ekspresją PECAM-1 i CD34 i wykrywana zdecydowanie częściej niż na CD31-pozytywnych komórkach płaskiego śródbłonna naczyń [77]. Endoglina uważana jest za jedną z najważniejszych glikoprotein także ludzkiego śródbłonna żylnego. Ekspresję cząsteczki wykazano na powierzchni komórek śródbłonna wszystkich tkanek z wyjątkiem szpiku kostnego [65].

Funkcje endogliny związane są z angiogenezą, adhezją i migracją komórkową oraz utrzymaniem homeostazy ściany naczyń [19]. Pod względem czynnościowym stanowi ona składnik kompleksu receptora dla transformującego czynnika wzrostu  $\beta 1$  i  $\beta 3$  (ang. *Transforming Growth Factor*, TGF) i determinuje los komórek macierzystych. Wpływa na różnicowanie fenotypu komórek śródbłonna w odmiennych tkankach, w tym naczyń typu HEV [77, 190]. W szlaku sygnalizacyjnym TGF- $\beta$ , endoglina aktywuje tę cytokinę, indukując proliferację komórek śródbłonna [19, 114]. Obecność sekwencji RGD w cząsteczce endogliny sugeruje jej rolę w procesie wiązania pomiędzy komórkami śródbłonna a integrzynami oraz innymi receptorami dla RGD. Sekwencja ta, będąca tripeptydem, odpowiada za adhezję i agregację komórek oraz bierze udział w interakcjach komórek z macierzą pozakomórkową [65].

Pod względem spełnianej roli w przechodzeniu leukocytów przez HEC, endoglina bierze udział w III (ściśła adhezja) oraz IV (transmigracja) etapie tego procesu.

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono zaledwie pojedyncze prace dotyczące ekspresji i roli endogliny w chorobach przyzębia. Taşman i wsp. (1999) badali ekspresję różnych cząsteczek adhezyjnych, w tym także endogliny (CD105) w miazdze zęba w pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i kontrolą, wykazując zmienną ekspresję tego markera

śródbłonna naczyń w materiale tkankowym obu grup [178]. Nie znaleziono prac dotyczących ekspresji endogliny w naczyniach typu HEV w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

#### **5.4. Cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1, CD54*)**

ICAM-1 jest glikoproteina, która podobnie jak PECAM-1 należy do nadrodziny immunoglobulin i bierze udział w III i IV etapie przechodzenia leukocytów przez komórki wysokiego śródbłonna [63, 189]. Masa cząst. waha się w przedziale od 70 do 120 kDa i zależy od stopnia glikozylacji. Gen kodujący ICAM-1 znajduje się na chromosomie 19 [145].

Cząsteczka podlega konstytutywnej ekspresji na powierzchni wielu komórek, z których najważniejsze to komórki śródbłonna i monocyty [145]. Należy dodać, iż ekspresja na komórkach śródbłonna jest indukowana przez mediatory zapalenia [34]. Forma rozpuszczalna cząsteczki – sICAM-1 (ang. *soluble intercellular adhesion molecule-1*) znajduje się w surowicy krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz płynie dziąsłowym [69, 145, 189]. Norma surowiczego stężenia u zdrowych osobników waha się od 100-200 ng/ml, a znacznie podwyższone stężenia sICAM-1 (200-700 ng/ml) obserwowano u pacjentów z zespołem niedoboru adhezji leukocytów (ang. *leukocyte adhesion deficiency, LAD*) [152].

W budowie ICAM-1 wyróżnić można fragment zewnątrzkomórkowy składający się z 5 immunoglobulinopodobnych domen oznaczanych D1 - D5 (453 aa), odcinek przezbłonowy oraz krótki odcinek wewnątrzkomórkowy, którego końcowy odcinek łączy się poprzez  $\alpha$ -aktynę i  $\beta$ -tubulinę z cytoszkieletem komórki. Domeny zewnątrzkomórkowe odpowiedzialne są za łączenie z ligandami i zawierają potencjalne miejsca glikozylacji [34].

Obecna na powierzchni śródbłonna żyłek z wysokim śródbłonkiem, cząsteczka ICAM-1 łączy się z integryną  $\beta$ 2 (CD11a/CD18 ) (dawna nazwa ang. *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1, LFA-1*) oraz białkiem MAC-1 (ang. *Membrane Attack Complex*) leukocytów, czego skutkiem jest ścisła adhezja (etap III przechodzenia poza naczynie krwionośne) [63, 180]. Wiele sygnałów komórkowych, w których pośredniczy ICAM-1 reguluje funkcje cytoszkieletu komórek *endothelium* HEV, stąd uważa się, że cząsteczka ta może brać udział w diapedezie leukocytów do miejsc zapalenia [34, 63, 189]. Wykazano, iż ICAM-1 aktywuje tzw. *Rho-like* GTP-azę oraz powoduje polimeryzację aktyny,

warunkującej ścisłą adhezję i wędrówkę leukocytów poprzez śródbłonek HEV [180]. Badania nad lokalizacją i rolą ICAM-1 przyczyniły się do wykazania, że wszystkie trzy rodzaje leukocytów (granulocyty, monocyty i limfocyty) mogą migrować poprzez ścianę HEV. Dodatkowo wykazano, że 5-10% leukocytów może przechodzić bezpośrednio poprzez cytoplazmę pojedynczych HEV (transport transcelularny), większość pomiędzy komórkami śródbłonka (transport paracelularny), pozostałe nie mają jasno wytyczonej „trasy” migracji. Interesujące były obserwacje, że para- i transcelularna diapedeza była skorelowana z obecnością ułożonych równolegle do wędrowania leukocytów, struktur zwanych *cup-like*, bogatych w ICAM-1 i cząsteczkę adhezji komórkowej naczyń (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule*, VCAM-1) [27]. Badanie trójwymiarowej lokalizacji ICAM-1 na powierzchni HEV, wykazało że cząsteczka ta jest najmocniej ekspozowana na powierzchni luminalnej HEV, tworząc mikrofałdy i bruzdy. Są również sugestie, że translokacja ICAM-1 do wgłębień na powierzchni śródbłonka reguluje diapedezę transcelularną ludzkich limfoblastów T [180].

Zaburzenia ekspresji ICAM-1 obserwuje się w wielu procesach zapalnych i alergicznych oraz nowotworach złośliwych u człowieka [189].

Blokowanie cząsteczek adhezyjnych, w tym szczególnie ICAM-1 stało się próbą terapii wielu schorzeń, m. in. przewlekłych chorób o nieznannej etiologii, chorób autoimmunizacyjnych, powikłań po oparzeniach i odmrożeniach oraz w zmniejszeniu obszaru martwicy po zawale mięśnia sercowego i udarze niedokrwinnym [63]. Zastosowanie tego typu terapii sugerowane jest również w chorobach przyzębia. Wykazano bowiem możliwość zahamowania śródbłonkowej ekspresji ICAM-1 w tych schorzeniach za pomocą antysensownych oligonukleotydów [124]. Badania ostatnich lat wykazały, że lek o nazwie resveratrol osłabia indukowaną LPS z *P. gingivalis* adhezję leukocytów do śródbłonka naczyń poprzez obniżenie ekspresji m.in. ICAM-1 na drodze sygnałowej NF- $\kappa$ B [142, 153].

Od lat 90-tych ubiegłego wieku prowadzone są badania nad rolą ICAM-1 w mechanizmach powstawania i progresji chorób przyzębia [31, 36, 58, 69, 174, 178]. Ekspresję różnych postaci tej cząsteczki (białko błonowe, postać rozpuszczalna) badano z użyciem różnych technik. Analiza stężenia rozpuszczalnej formy ICAM-1 (sICAM-1) w płynie dziąsłowym wykazała wzrost wydzielania tego białka do płynu międzykomórkowego w korelacji z obecnością płytki nazębnej i stanem zapalnym, a nie z konkretną jednostką chorobową przyzębia (zapalenie dziąsła, CP, agresywne zapalenie przyzębia) [115]. ICAM-1 wykazywano zarówno w komórkach nabłonka łączącego dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej

[36, 171, 207], komórkach śródbłonna naczyń dziąsła, jak i na leukocytach nacieków zapalnych tkanki łącznej dziąsła [36, 171]. Ekspresję cząsteczki opisano w pętłach włósczkowych dziąseł dotkniętych stanem zapalnym, jednak w przeciwieństwie do PECAM-1 ekspresja ta dotyczyła jedynie części naczyń [182]. Badania komórkowej ekspresji ICAM-1 połączone z analizą gęstości naczyń dziąseł, nie wykazały istotnych różnic pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia i kontrolą [31]. Badania Tancharoen'a i wsp. (2008) wykazały wzrost ekspresji akwaporyny 3 (AQP3) oraz ICAM-1 w keratynocytach nabłonka dziąsła, co potwierdzono na modelu *in vitro*. Regulacja odpowiedzi zapalnej wydaje się zależeć od drogi sygnałowej TNF- $\alpha$  [174]. Spadek naczyniowej ekspresji ICAM-1 u palaczy z *periodontitis* w obrębie fragmentów *lamina propria* dziąsła nie objętych zapaleniem, wskazuje na wpływ palenia tytoniu na systemową produkcję ICAM-1, niezależną od lokalnego nasilenia zmian zapalnych w tkankach przyzębia [150]. Precyzowano na których dokładnie komórkach nacieków zapalnych dziąsła występuje pozytywna ekspresja ICAM-1. Część badaczy ekspresję tę obserwowała głównie na limfocytach T [58, 76]. Wykazano zbliżone wartości „limfocytarnej” (limfocyty T CD29+) ekspresji ICAM-1 w dziąsłach pacjentów z *gingivitis* i *periodontitis*. Potwierdzono ekspresję ICAM-1 także na komórkach śródbłonna naczyń oraz wykazano dodatkowo w keratynocytach nabłonka kieszonki przyzębnej. Ekspresja w keratynocytach wzrastała wraz z nasileniem zmian zapalnych [58]. Badania ekspresji ICAM-1 przeprowadzono także w miazdze zęba pacjentów z CP, wykazując zmienną pozytywną reakcję na ten marker, bez istotnych korelacji z innymi cząsteczkami adhezyjnymi [178].

Badanie ekspresji ICAM-1 w komórkach nabłonka jamy ustnej i/lub śródbłonna naczyń w powiązaniu z wpływem na ten proces antygenów bakteryjnych stanowi dość ciekawy model badawczy, także w kontekście ewentualnej terapii anti-ICAM-1 w schorzeniach przyzębia. Wyniki badań Tada i wsp. (2003) na hodowanych komórkach ludzkiego nabłonka jamy ustnej (KB i HSC-2) wykazały bezpośrednią proteolizę ICAM-1 przez gingipainy *P. gingivalis* i spadek ekspresji tego białka w badanych liniach komórkowych [169]. Tamai i wsp. (2005) po zastosowaniu przeciwciał anti-ICAM-1, obserwował zahamowanie inwazji *P. gingivalis* do linii komórkowej KB, co sugeruje, że ICAM-1 pełni istotną rolę w pierwszych etapach rozwoju i progresji schorzeń przyzębia [172]. Z kolei stosunkowo niedawno opublikowana praca Zhanga i wsp. (2010) analizująca ekspresję ICAM-1 na komórkach śródbłonna żył pępowinowych (linia ECV-304) traktująca te komórki szczepami *P. gingivalis* o różnej wirulencji, dowodzi indukcji ekspresji ICAM-1, nieco większej w przypadku szczepu bakteryjnego o większej inwazyjności. Ponadto wykazano, że indukcja produkcji ICAM-1 zachodzi z udziałem drogi sygnałowej NF- $\kappa$ B, a nie p38MAPK [212].

## 5.5. Laminina

Jest glikoproteiną macierzy pozakomórkowej o masie cząst. 900 kDa, markerem charakterystycznym dla błony podstawnej komórek śródbłónka naczyń krwionośnych. Stanowi główny niekolagenowy składnik blaszki jasnej błony podstawnej tworząc strukturę o charakterze sieciowym. Zbudowana jest z trzech łańcuchów: alfa-1, beta-1 oraz gamma-1 (wcześniej nazywany beta-2) tworzących cząsteczkę o kształcie krzyża, w którym występują 3 ramiona krótkie i jedno długie. Łańcuch alfa-1 posiada m. cząst. 440 kDa, zaś beta-1 i gamma ok. 220 kDa [14]. Pojedyncze łańcuchy stabilizowane są mostkami dwusiarczkowymi. Ze względu na występowanie 5 rodzajów łańcucha alfa, 4 beta oraz 3 gamma, występuje 15 izoform cząsteczki tworzących rodzinę laminin [7]. Węglowodany stanowią 25 do 30% masy cząsteczki. Laminina może tworzyć polimery. U człowieka, domeny odpowiedzialne za biologiczną aktywność cząsteczki przejawianą przez udział w adhezji i migracji komórkowej, wiązaniu heparyny oraz wzroście aksonów, znajdują się w łańcuchu alfa3 [187]. Geny kodujące ludzką lamininę znajdują się w różnych odcinkach genomu (chromosom 1, 3, 6, 7, 18) [213]. I tak np. gen kodujący łańcuch alfa-1 (*LAMA1*) lamininy zlokalizowano na chromosomie 18p11.3, a łańcuch alfa-3 (*LAMA3*) na chromosomie 18q11.2 [123].

Laminina charakteryzuje się szerokim spektrum działania, począwszy od pobudzania interakcji międzykomórkowych, wzrostu i różnicowania tkanek i komórek, kończąc na oddziaływaniu na komórki nabłonka, śródbłónka oraz na inne składowe blaszki podstawnej (łączy się z heparanowymi łańcuchami proteoglikanów oraz z kolagenem IV). Uważana jest za najbardziej aktywny biologicznie składnik błony podstawnej. Mnogość funkcji lamininy wynika z obecności w cząsteczce wielu domen o różnej strukturze i funkcji oraz z jej trójwymiarowej budowy. Ekspresja lamininy na komórkach śródbłónka może być regulowana przez cytokiny i czynniki wzrostowe uwalniane podczas procesu zapalnego [68]. Postulowane funkcje cząsteczki związane z komórkami śródbłónka to udział w formowaniu nowych naczyń i utrzymywanie ich stabilności. Należy dodatkowo wspomnieć o roli lamininy w tworzeniu barierowej funkcji śródbłónka, warunkowaniu jego wybiórczej przepuszczalności, a także jej udziale w przenoszeniu sygnałów w obrębie ściany naczynia. Laminina uczestniczy także w wędrówce leukocytów, lecz jej rola nie jest do końca poznana. Wraz z fibronektyną może wspomagać ścisłą adhezję leukocytów będąc ligandem dla wielu integryn [63, 64]. Najważniejszą rolę w biologii limfocytów krwi (adhezja, migracja, proliferacja) wydaje się odgrywać 5 łańcuch alfa lamininy [64].



W błonach podstawnych HEV obecnych w węzłach chłonnych człowieka wykazano obecność różnych łańcuchów lamininy (alfa3, alfa4, alfa5, beta1, beta2, gamma1) [64]. Cząsteczka ta stymuluje także fagocytozę [Gołąb J., Jakóbiński M. ]. Dowiedziono udziału lamininy w procesie tworzenia przerzutów nowotworowych.

Jedynie nieliczne doniesienia z piśmiennictwa dotyczą badania roli lamininy w zdrowym dziąśle i chorobach przyzębia u ludzi [146, 162]. Za pomocą metod immunohistochemicznych w prawidłowych tkankach przyzębia naczelnych, laminina została zlokalizowana wyłącznie w tkankach miękkich przyzębia jako składnik błon podstawnych nabłonka dziąsłowego oraz komórek śródbłonka [162]. W zaawansowanym zapaleniu przyzębia, Pinchback i wsp. (1996) obserwował wyraźne okołonaczyniowe odkładanie składników błony podstawnej (laminina, kolagen typu IV), szczególnie w naczyniach żylnych. Naczynia otoczone były złogami obu białek, niektóre posiadały otoczkę składającą się tylko z lamininy, bądź z kolagenu typu IV. Autorzy sugerowali znaczącą patologię naczyń w *periodontitis* z osłabieniem reakcji zapalnej i możliwości gojenia się procesu zapalnego przez ziarninowanie [146].

## **5.6. Kolagen typu IV**

Kolagen typu IV jest głównym składnikiem błony podstawnej. Syntetyzowany jest przez komórki nabłonków (w tym śródbłonek) i komórki mięśniowe gładkie. Należy do rodziny białek kolagenowych, która składa się z co najmniej 27 genetycznie odrębnych typów o różnej masie cząsteczkowej i składzie aminokwasowym. Jest glikoproteiną o charakterze niewłókienkowym, a jego cechą charakterystyczną jest tworzenie układów sieciowych. Cząsteczka została odkryta w 1966 roku przez Kefalidesa [90]. Na strukturę kolagenu typu IV występującego u ssaków składa się 6 podjednostek alfa (alfa1-alfa6) występujących w różnych kombinacjach. Podjednostki te tworzą 3 rodzaje protomerów warunkujących występowanie 3 różnych układów sieciowych. Cząsteczka posiada budowę wielodomenową. Potrójna helisa o długości około 390 nm łączy obie wymienione domeny [8]. Struktura helikalna nie jest ciągła. Duża ilość mostków dwusiarczkowych występujących w cząsteczce zapewnia jej stabilność. Wielodomenowa budowa kolagenu typu IV posiada swoje odzwierciedlenie w mnogości miejsc potencjalnej interakcji z innymi cząsteczkami oraz komórkami. Potrójna helisa posiada rejony, z którymi łączy się laminina, fibronektyna oraz siarczan heparanu [8]. W oczkach sieci wytwarzanej przez kolagen typu IV lokalizują się

inne składniki błon podstawnych oraz macierzy pozakomórkowej. Właśnie połączenie z innymi składnikami błon i macierzy warunkuje prawie całkowitą nierozpuszczalność cząsteczki. U ssaków zidentyfikowane zostało 6 genów, które kodują informacje o budowie 6 różnych łańcuchów polipeptydowych kolagenu typu IV. Pary łańcuchów alfa-1 i alfa-2 kolagenu IV kodowane są na chromosomie 13, alfa-3 i alfa-4 na chromosomie 2, a pary alfa-5 i alfa-6 na chromosomie X. Wybiórcza ekspresja tych genów podczas rozwoju embrionalnego pozwala na rozwój różnych strukturalnie i biochemicznie form cząsteczki mających wpływ na charakter tkanki, w której ona występuje [91]. Kolagen typu IV występuje we wszystkich błonach podstawnych w formie sieci o dużej powierzchni zapewniającej mechaniczną stabilność błon. Stanowi swoistą strukturę podporową dla komórek nabłonka oraz warunkuje ich wybiórczą przepuszczalność [177]. Wraz z lamininą odgrywa istotną rolę w adhezji, różnicowaniu i wzroście komórek, a także w procesie naprawy tkanek [8]. Bardzo ważna jest regulatorowa funkcja kolagenu typu IV w procesie angiogenezy. Fragmenty kolagenu typu IV mogą hamować funkcję czynników wzrostowych wydzielanych w czasie angiogenezy, a tym samym spowalniać lub hamować ten proces [33].

Kwestią interesującą jest powiązanie cząsteczki z pogrubiłą blaszką podstawną żyłek o wysokim śródbłonku. Blaszka ta składa się z wielu okrężnych warstw niezwykle bogatych w kolagen typu IV, który może łączyć się z „limfocytarnymi” chemokinami, takimi jak CCL21, CXCL12 i CXCL13 [209]. Łączenie to zapewnia odpowiednie stężenie wyżej wymienionych chemokin przez ich unieruchomienie w środowisku, charakteryzującym się silnym prądem krwi i jest niezbędnym elementem systemu wędrówki limfocytów przez HEV.

Spośród 5 typów kolagenu opisanych w dziąśle, kolagen typu IV jest głównym składnikiem zewnątrzkomórkowej macierzy tkanki łącznej tej części przyzębia [24, 94]. Badania komórkowe nad ekspresją kolagenu IV w tkankach dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, potwierdziły jego ekspresję w błonach podstawnych nabłonka dziąsła. Błony podstawne (głównie szczytowych części kieszonek przyzębnych) były ścieńczałe i niekiedy pofragmentowane [144]. Podobnie badania ultrastrukturalne Chavriera i Couble'a (1989) u pacjentów z szybko postępującym zapaleniem przyzębia, lokalizowały kolagen typu IV wyłącznie w *lamina densa* błony podstawnej i potwierdziły degradację tej struktury na poziomie ultrastrukturalnym [29]. Nieznane są mechanizmy molekularne utraty kolagenu w zapaleniach przyzębia. Badania porównawcze nad ilością całkowitego kolagenu w różnych postaciach zapaleń przyzębia, wskazują na największy ubytek lokalny tego białka nie w zapaleniu przyzębia dorosłych, a w agresywnym zapaleniu przyzębia (ang. *early onset*

*periodontitis*, EOP). Jeśli wzięto pod uwagę stosunek samych włókien kolagenowych do składników niewłókiennych, spadek taki obserwowano w przypadku AP w porównaniu z EOP czy kontrolą [24].

### **5.7. Naczynio-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF)**

Naczynio-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), określany również jako czynnik przepuszczalności naczyń (ang. *Vascular Permeability Factor*, VPF) należy do rodziny VEGF i jest specyficznym mitogenem komórek śródbłonka *in vitro* oraz induktorem angiogenezy *in vivo* [49, 51, 79, 208]. Opisano znaczącą rolę VEGF w morfogenezie naczyń krwionośnych. VEGF indukuje geny drogi sygnałowej Notch w tworzeniu naczyń tętniczych, a zahamowanie genu *Nrp1* oraz *Notch* prowadzi do różnicowania w kierunku naczyń żylnych [101]. VEGF odgrywa znaczącą rolę w procesie gojenia ran oraz progresji zapalenia [23, 49, 50].

Ludzki gen *VEGFA* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 6 [185]. Alternatywny *splicing* daje ekspresję 6 różnych izoform VEGF, tzn. VEGF 121, 145, 165, 183, 189 i 206. Natywne białko VEGF jest homodimeryczną glikoproteiną wiążącą heparynę o m.cz. 45 kDa [50]. VEGF 121, zwany także VEGF-A jest słabo-kwaśnym polipeptydem niezdolnym do wiązania heparyny, natomiast VEGF-165 (zwany także VEGF-B) oraz VEGF-189 (VEGF-C) są silniej zasadowymi białkami i z większym powinowactwem niż VEGF-A, wiążą heparynę i są całkowicie sekwestrowane w macierzy pozakomórkowej [143]. Wśród wszystkich izoform, VEGF-B jest dominującą formą molekularną produkowaną przez prawidłowe komórki i tkanki. Natomiast VEGF-A oraz VEGF-C są najczęściej wykrywanymi izoformami całej rodziny VEGF w tkankach, w których gen *VEGFA* ulega ekspresji [50].

Z badań eksperymentalnych wynika, że VEGF (obok bFGF) bierze udział w remodelowaniu naczyń krwionośnych w przewlekłym zapaleniu różnych narządów [106, 122, 131, 208]. W procesie gojenia ran najpierw działa bFGF, a potem VEGF, który wykazuje przedłużone działanie proangiogenne [131].

Miejsca wiązania VEGF występują na komórkach śródbłonka naczyń. Jego lokalizację potwierdzono także w składnikach macierzy pozakomórkowej [79, 143]. VEGF uczestniczy w indukowaniu transportu pomiędzy i poprzez komórki śródbłonka naczyń krwionośnych,

zwłaszcza żyłek [111]. Wykazano przy tym, że receptor o wysokim powinowactwie do VEGF (VEGFR-2) znajduje się na tzw. pęcherzykowo-wodniczkowych organellach (ang. *vesiculo-vacuolar organelle*, VVO) w komórkach śródbłonka mikronaczyń towarzyszących guzom, żyłek powstających w zapaleniach alergicznych oraz na śródbłonku normalnych żyłek [44]. VEGF posiada zdolność do zwiększania przepuszczalności naczyń poprzez produkcję tkankowej kolagenazy, aktywatorów plazminogenu, a także inhibitora aktywatora plazminogenu w komórkach śródbłonka naczyń [51]. Wzrost przepuszczalności naczyń pod wpływem VEGF sprzyja zewnątrznaczyniowemu odkładaniu się fibryny, która stanowi szkielet dla migrujących komórek śródbłonka [48]. Jest to jeden z etapów angiogenezy. Można sądzić nawet, że VEGF działa już na wcześniejszych etapach powstawania naczyń krwionośnych w warunkach patologicznych, a mianowicie na etapie inicjacji tego procesu, wywołanego miejscowym uszkodzeniem tkanki (rana), jak i lokalnym procesem zapalnym [10, 106, 131]. Po zadziałaniu czynnika inicjującego dochodzi do wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych, degradacji błony podstawnej naczynia, rozluźnienia połączeń między komórkami śródbłonka, aktywacji tych komórek oraz płytek krwi [10, 109]. Do czynników indukujących pośrednio proliferację naczyń krwionośnych w zapaleniu poprzez wzmaganie produkcji VEGF, należą następujące mediatory zapalenia: prostaglandyna E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), IL-1 [15] oraz IL-6 [32]. Wykazano, że IL-6 wpływa na zwiększanie ekspresji mRNA VEGF działając na fragment 5'-UTR promotora genu *VEGF* o zasadniczej roli w indukcji angiogenezy [32]. Innym czynnikiem wzmagającym produkcję VEGF i tym samym sprzyjającym powstawaniu nowych naczyń jest hipoksja [51]. Rola VEGF w angiogenezie wiąże się także z indukowaniem drogi związanej z naczyniową integryną  $\alpha\beta 5$  zależną od aktywacji kinazy białkowej C [52].

Głównym komórkowym źródłem VEGF-u są makrofagi [122, 188]. Inne podawane źródła komórkowe VEGF: fibroblasty, komórki mięśniowe gładkie naczyń oraz perycyty [45, 122]. Obecność VEGF wykazano także w komórkach pokrywających torebki stawowe [122] i w keratynocytach nabłonka dziąsłowego [28]. VEGF działa przez swoiste receptory, które tworzą rodzinę receptorów VEGF i znajdują się prawie wyłącznie na komórkach *endothelium* naczyń oraz w mniejszej ilości na monocytach. Specyficzne wiązanie VEGF na komórkach, dotyczy zarówno spoczynkowych, jak i proliferujących komórek śródbłonka różnych typów naczyń krwionośnych [79].

Wykazano trzy formy receptora VEGF: VEGFR-1 (Flt-1) występujący u dorosłych osobników, VEGFR-2 (KDR/Flk-1) występujący wyłącznie w okresie rozwoju embrionalnego oraz VEGFR-3 (Flt-4). Należą one do rodziny receptorów kinazy

tyrozynowej a ich stymulacja prowadzi do wzrostu stężenia jonów wapnia w cytozolu komórek śródbłonka, aktywacji fosfolipazy C i fosforylacji białek [50, 192]. Receptory VEGF uczestniczą w transdukcji sygnałów, które pośredniczą w proliferacji naczyń, ich migracji, organizacji w funkcjonalne naczynia krwionośne oraz w remodelowaniu sieci naczyniowej [192]. Opisano szereg koreceptorów właściwych receptorów VEGF np. neuropilinę-1 (Nrp-1) dla VEGF 164, które ułatwiają przebieg transdukcji sygnałów i ulegają ekspresji na komórkach śródbłonka naczyń tętniczych [101]. Podejmuje się badania nad zastosowaniem różnych inhibitorów receptorów VEGF jako strategii zapobiegania angiogenezie, szczególnie w onkologii [50].

Wyniki badań nad rolą VEGF-u w etiopatogenezie chorób przyzębia znane są od końca lat 90-tych XX wieku [23, 80, 129]. Badania Booth i wsp. (1998) po raz pierwszy wykazały tkankową ekspresję VEGF w komórkach śródbłonka naczyń, neutrofilach, komórkach plazmatycznych i komórkach nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej [23]. Zmiany w stężeniu VEGF w ślinie i w płynie dziąsłowym pacjentów z chorobami przyzębia w porównaniu ze zdrową populacją wyraźnie zainspirowały do dokładniejszych badań ekspresji VEGF w periodontologii [23, 148]. Pierwsze badania stężenia VEGF w dziąsłach zdrowych i zmienionych zapalnie, wykazały najwyższe stężenie tego czynnika wzrostu w wycinkach patologicznych dziąseł sąsiadujących z kieszonką przyzębną o głębokości 4-6 mm. Istotnie niższe stężenia VEGF dotyczyły dziąseł kontrolnych [80]. Autorzy konkludują, że VEGF może być uznany za czynnik zarówno inicjacji, jak i progresji *gingivitis* do *periodontitis*, najprawdopodobniej poprzez ekspansję sieci naczyń krwionośnych z jednoczesną progresją procesu zapalnego [80]. Rolę VEGF jako biomarkera progresji chorób przyzębia potwierdzają nowsze badania. Wykazano dwukrotną redukcję VEGF w płynie dziąsłowym po zastosowanej terapii chorób przyzębia [148]. Ponadto badania te wskazywały na korelacje pomiędzy stężeniem VEGF w płynie dziąsłowym a klinicznymi parametrami pacjentów z CP (wskaźnik dziąsłowy, CAL, radiologiczny ubytek kości) [148]. Wzrost tkankowej ekspresji VEGF obserwowano także w dziąsłach pacjentów z cukrzycą i chorobami przyzębia w porównaniu ze zdrową kontrolą [6, 188]. Obserwowano liczniejsze VEGF-pozytywne keratynocyty nabłonka kieszonki przyzębnej u pacjentów z cukrzycą i *periodontitis* w porównaniu z pacjentami kontrolnymi [6]. Inni autorzy zasugerowali, że VEGF może być związany z etiologią *periodontitis* we wczesnych stadiach choroby, kiedy powstawanie nowych naczyń krwionośnych stymulowane przez patogeny jamy ustnej wiąże się z obrzękiem tkanek przyzębia [165]. VEGF był wykrywany w różnych tkankach

przyzębia oraz w ślinie. Postulowano dlań ważną rolę w utrzymywaniu homeostazy oraz w prawidłowym gojeniu się ran w jamie ustnej [23, 140, 170]. Konstytutywną produkcję VEGF (mRNA i białko) wykazywano zarówno w zdrowych, jak i zapalnie zmienionych gruczołach ślinowych („ślinowy system VEGF”), z tym że w zapalnie zmienionych śliniankach czynnik ten obecny był także w jednojądrzastych komórkach nacieków zapalnych [140, 170]. Wykazano przy tym wyższe stężenie VEGF w płynie dziąsłowym (ang. *gingival crevicular fluid*) w porównaniu z surowicą, co świadczyłoby o lokalnej produkcji VEGF [23]. Wyższe stężenia lokalnie produkowanego VEGF obserwowano przy tym w „zdrowszych” miejscach dziąsła w porównaniu z bardziej zmienionymi chorobowo w *gingivitis* [23]. W przypadku zaawansowanego *periodontitis* proces remodelowania naczyń krwionośnych z udziałem VEGF został jedynie częściowo zdefiniowany [28]. W badaniach immunocytochemicznych grupa Chapple i wsp. (2000) wykazała znaczące różnice w lokalizacji i rozmieszczeniu VEGF w obrębie dziąseł z minimalnymi zmianami zapalnymi i w zaawansowanym *periodontitis* [28]. Przeważała lokalizacja VEGF w keratynocytach prawidłowego nabłonka dziąsła i znaczące zmniejszenie ekspresji tej glikoproteiny w nabłonku kieszonki przyzębnej [28]. Autorzy uzasadniają swe obserwacje licznymi dowodami na rolę czynników bakteryjnych w zmianie ekspresji nabłonkowych czynników wzrostu, w tym VEGF [28]. Choć autorzy ci obserwowali VEGF-immunoreaktywne komórki także w obrębie naczyń krwionośnych dziąsła i komórek nacieków zapalnych, przeważała lokalizacja w cytoplazmie keratynocytów nabłonka dziąsła [28]. Nie potwierdzono więc lokalizacji VEGF w makrofagach jako głównego źródła komórkowego VEGF, opisywanego przez innych badaczy w reumatoidalnym zapaleniu stawów [122] oraz w dziąsłach cukrzyków z chorobami przyzębia [188]. Inne podawane źródła komórkowe VEGF (białko i mRNA) to: fibroblasty dokoła naczyń krwionośnych, komórki mięśniowe gładkie naczyń i komórki pokrywające torebki stawowe [122].

Inne badania donoszą o konstytutywnej produkcji VEGF (białko i mRNA) przez hodowane fibroblasty ludzkiego dziąsła (ang. *human gingival fibroblasts*, HGF) po stymulacji za pomocą antygenów bakteryjnych z *Actinobacillus actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis*, ale nie samym LPS [165]. Produkowany przez fibroblasty dziąsła VEGF wykazywał zdolność do zwiększania przepuszczalności naczyń krwionośnych *in vivo* [165]. Stosunkowo niedawne badania grupy Koo i wsp. (2007) wskazują, że sam LPS uzyskany z *P. gingivalis* aktywował angiogenezę, migrację, inwazję i tworzenie ludzkich komórek śródbłonka naczyń pepowinowych (HUVECs). Nie miał on wpływu na naczyniową ekspresję VEGF oraz jego receptora Flk-1. Sugeruje to bezpośredni wpływ LPS *P. gingivalis* na aktywację komórek śródbłonka naczyń [96].

### **III. Założenia i cel pracy**

Rozwój chorób przyzębia jest związany z rozplemem małych naczyń krwionośnych. Występują wyspecjalizowane formy żyłek pozawłosowatych z tzw. z wysokim śródbłonkiem (HEV). Obecność HEV w przewlekłym zapaleniu przyzębia, przy nieobecności w zdrowym dziąśle nasuwa przypuszczenie, że pełnią one ważną rolę w patogenezie tej choroby u człowieka [204]. Występuje zwiększona reaktywność komórek śródbłonka naczyniowego na czynniki infekcyjne. Wyniki najnowszych badań przynoszą odkrycia dotyczące molekularnych aspektów przechodzenia leukocytów przez HEV, interakcji międzykomórkowych (śródbłonek-leukocyty) oraz ekspresji licznych genów charakterystycznych, choć nie zawsze specyficznych dla komórek wysokiego śródbłonka [9, 46, 77, 86, 137, 209].

Nadal niejasne są mechanizmy plastyczności komórek wysokiego śródbłonka (HEC) oraz mechanizmy patogenetyczne odpowiedzialne za rozplem żyłek HEV w tkankach dziąsła dotkniętych przewlekłym zapaleniem przyzębia [55, 104]. Niedokończona jest również lista markerów typowych dla HEV w zapalnie zmienionych narządach [86, 121, 180].

Celem obecnej pracy jest immunocytochemiczna charakterystyka markerów komórek wysokiego śródbłonka żyłek pozawłosowatych (HEV) występujących w dziąsłach pacjentów z CP z dokładniejszym określeniem roli HEV w progresji przewlekłego zapalenia przyzębia.

#### **Cele szczegółowe pracy:**

1. Analiza komórkowej ekspresji antygenów błonowych (CD34, CD31, CD105, ICAM-1), białek błony podstawnej komórek śródbłonka naczyń krwionośnych (kolagen IV, laminina) oraz naczynio-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia.
2. Charakterystyka morfologiczna żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) oraz ilościowa ocena ekspresji markerów komórek śródbłonka (HEC) w przewlekłym zapaleniu przyzębia.
3. Próba określenia korelacji pomiędzy tkankową ekspresją antygenów naczyń krwionośnych dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (w tym HEV) a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów.

## **IV. MATERIAŁ I METODY**

### **1. MATERIAŁ DO BADAŃ**

Tkankowy materiał do badań stanowiły wycinki dziąseł pobrane od pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia podczas zabiegu kiretażu otwartego z gingiwektomią (ang. *flap operation*) oraz fragmenty dziąseł od pacjentów bez klinicznych cech choroby przyzębia (kontrola).

Materiał do badań pochodził ogółem od 62 pacjentów dorosłych i dla celów porównawczych wyróżniono 3 grupy:

- I. Grupa badana (n=40) - pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP);
- II. Grupa kontrolna 1 (K1) (n=15) – pacjenci z klinicznie zdrowym przyzęciem, którym wycinki dziąseł pobrano podczas zabiegów periochirurgii estetycznej, odsłonięcia zębów zatrzymanych i/lub ekstrakcji zębów;
- III. Grupa kontrolna 2 (K2) (n=7) – pacjenci, którym w przebiegu diagnostyki choroby podstawowej (przewlekłe zapalenia, nowotwory) rozpoznano odczynowe zmiany w okolicznych węzłach chłonnych (materiał archiwalny).

Materiał tkankowy w przypadku grupy badanej (CP) oraz grupy kontrolnej negatywnej (K1) wraz z danymi klinicznymi otrzymano z Prywatnej Praktyki Stomatologicznej w Ostrowie Wlkp (dr n. med. Miłosz Hausmann).

Kostki parafinowe z materiałem kontrolnym pozytywnym (K2) uzyskano z Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Cały materiał tkankowy został zakwalifikowany do badań po uprzednim badaniu histopatologicznym.



## 2. METODY BADAŃ

### 2.1. Badanie kliniczne pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

Badanie kliniczne pacjentów obejmowało badanie podmiotowe i przedmiotowe. Na podstawie wywiadu wykluczono czynniki ryzyka dla chorób przyzębia, takie jak cukrzyca, choroby zakaźne, choroby serca, nadciśnienie, zażywane leki, palenie tytoniu. Następnie dokonano oceny stanu jamy ustnej pod względem periodontologicznym. W badaniu przedmiotowym oceniano stan przyzębia. Badanie przyzębia obejmowało ocenę objawów zapalenia (zaczerwienienie, obrzęk, ból, krwawienie podczas zgłębnikowania kieszonek przyzębnych, wysięk z kieszonek przyzębnych) oraz ruchomość i patologiczną wędrowkę zębów. Na zdjęciach rentgenowskich zwracano uwagę na lokalizację, kształt i zakres ubytku kości. Parametrem określającym stopień zaawansowania choroby był kliniczny poziom/utrata przyczepu (ang. *clinical attachment level/loss*, CAL). Parametr ten badano przy użyciu urządzenia Florida Probe®. System ten składa się z periodontologicznej sondy optycznej PD/CEJ oraz programu komputerowego FP32 v.6. Sonda PD/CEJ (10,8x0,45 mm STANDARD) posiada dokładność 0,2 mm przy nacisku odpowiadającym ciężarowi 15g (Rycina 1).

Wartości CAL określano jako odległości pomiędzy połączeniem szklwno-cementowym (ang. *cementoenamel junction*, CEJ) a dnem kieszonki przyzębnej i wyróżniono następujące zakresy tego parametru:

- CAL I -  $\leq 3$  mm
- CAL II – 4-6 mm
- CAL III  $\geq 7$  mm

Parametr ten określano dla każdego z badanych zębów na sześciu powierzchniach: policzkowej bliższej, policzkowej, policzkowej dalszej, językowej ( lub podniebiennej) dalszej, językowej (lub podniebiennej) i językowej (lub podniebiennej) bliższej, tak jak określa to procedura badania periodontologicznego.



**Rycina 1.** Urządzenie Florida Probe®. W skład systemu wchodzi optyczna sonda periodontologiczna PD/CEJ i program komputerowy FP32 v.6. Sonda PD/CEJ (10,8x0,45 mm STANDARD) dokonuje pomiaru z dokładnością do 0,2 mm przy nacisku 15g (Rycina pochodzi z materiałów producenta sprzętu, wykorzystano za zgodą dra n. med. M. Hausmanna).

## 2.2. Pobieranie wycinków dziąsła

Wycinki dziąsła w liczbie od jednego do kilku pobierano podczas zabiegu kiretażu otwartego z gingiwektomią (operacja płatowa, ang. *flap operation*) za pomocą skalpela z różnych sekstantów, z okolic różnych zębów szczęki i żuchwy. Wycinki te pochodziły głównie z okolicy siekaczy, kłów i zębów przedtrzonowych. Zabieg gingiwektomii wykonywany był tylko u pacjentów stosujących się do zaleceń i po przeprowadzeniu higienizacyjnej fazy leczenia periodontologicznego (wskaźnik API<15%). W przypadku postaci zlokalizowanej CP materiał pobierano z okolicy objętej zapaleniem, w przypadku postaci uogólnionej materiał pobierano z kilku okolic. Od każdego pacjenta pobierano więc od 1 do 4 fragmentów tkanek dziąsła z okolicy różnych zębów, o różnych wartościach CAL. Materiał tkankowy dla grupy kontrolnej uzyskano podczas zabiegów ekstrakcji zębów zatrzymanych, chirurgicznego wytworzenia „okienka ortodontycznego” podczas ortodontycznego leczenia zębów zatrzymanych, bądź podczas zabiegu wydłużania korony klinicznej. Kwalifikacja materiału z grupy kontrolnej do badań poprzedzona była badaniem histopatologicznym. Materiał tkankowy o średniej wielkości wynoszącej 4x2x2mm po uprzednim 24 godzinnym utrwalaniu w 4% roztworze zbuforowanej formaliny zatapiano w

parafinie otrzymując bloczki parafinowe. Bloczki parafinowe skrojono otrzymując kolejne (seryjne) skrawki o grubości około 5  $\mu\text{m}$ , które przenoszono na szkiełka SuperFrost/Plus. Badania z wykorzystaniem skrawków parafinowych obejmowały:

1. rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)
2. reakcje immunocytochemiczne z użyciem monoklonalnych mysich przeciwciał do wykrywania markerów naczyniowych (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka przeciwciał zastosowanych w pracy.

<b>Wykrywany antygen</b>	<b>Klon przeciwciał</b>	<b>Producent przeciwciał, zastosowane rozcieńczenie i typ przeciwciał</b>
<b>CD34 Class II</b>	QBEnd 10	DAKO, 1:50, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>PECAM-1 (CD31)</b>	JC70A	DAKO, gotowe do użycia, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Endoglina (CD105)</b>	4G11	NOVOCASTRA 1:100, mysie monoklonalne
<b>ICAM-1 (CD54)</b>	23G12	DAKO, 1:100, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Kolagen typu IV</b>	CIV 22	DAKO, gotowe do użycia, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>Laminina</b>	4C7	DAKO, 1:50, mysie monoklonalne anty-ludzkie
<b>VEGF</b>	VG1	DAKO, 1:50, mysie monoklonalne anty-ludzkie

### **2.3. Badanie histologiczne preparatów dziąseł barwionych hematoksyliną i eozyną**

Rutynowe barwienie z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny (H+E) dotyczyło 66 preparatów histologicznych dziąseł pochodzących od 40 pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Takie samo barwienie wykonane zostało w przypadku 15 preparatów kontrolnych (K1) oraz 7 preparatów z fragmentami odczynowych węzłów chłonnych.

W barwieniu klasycznym H+E w analizie unaczynienia tkanki zwracano uwagę na ogólną dystrybucję naczyń krwionośnych w tkance łącznej blaszki właściwej błony śluzowej (*lamina propria*), typ i strukturę naczyń krwionośnych, obecność erytrocytów i białych krwinek w świetle naczyń oraz towarzyszące naczyniom nacieki zapalne.

Szczególną uwagę zwracano na żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem (HEV, *HEV-like*) oraz typowe (zwykłe) naczynia krwionośne dziąsła wysłane typowym, płaskim śródbłonkiem.

Oceniano także wielkość i rozmieszczenie nacieku zapalnego (ogniskowy, rozlany).

Nasilenie zmian zapalnych (*grading*) określano w 4-stopniowej skali półilościowej:

- 3 punkty - intensywny, w tym najczęściej rozlany naciek zapalny,
- 2 punkty - średnio intensywny, ale także rozlany naciek zapalny,
- 1 punkt - pojedyncze rozproszone komórki zapalenia lub ułożone ogniskowo komórki nacieku w blaszce właściwej błony śluzowej,
- 0 punktów - brak komórek nacieków zapalnych.

#### **2.4. Technika immunocytochemiczna ABC**

Do wykrywania i badania ekspresji markerów naczyń krwionośnych (w tym HEV) wykorzystano klasyczną technikę ABC (strept(awidyna)-biotynyłowana peroksydaza) według Hsu i wsp. (1981) [75].

Etapy reakcji immunocytochemicznej ABC są następujące:

1. odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu (2x100%, 90%, 85%, 80%, 70%),
2. płukanie w wodzie bieżącej - 10 min.,
3. blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w H<sub>2</sub>O destylowanej - 30 min.,
4. płukanie w wodzie bieżącej - 10 min.,
5. płukanie w wodzie destylowanej - 10 min.,
6. inkubacja w normalnej surowicy koziej (1:20, DAKO) - 30 min.,
7. inkubacja ze swoistymi przeciwciałami - 18 godz. w temperaturze 4<sup>0</sup>C, a następnie przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej,
8. płukanie w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami (PBS) - 3×3 min.,
9. inkubacja z biotynyłowanymi przeciwciałami (LSAB2, DAKO) - 20 min.,
10. płukanie w PBS - 3×3 min.
11. inkubacja z kompleksem streptawidyna- biotynyłowana peroksydaza (LSAB2, DAKO) - 20 min.,
12. płukanie w PBS - 3×3 min.,

13. inkubacja z 3-3' diaminobenzodyną (DAB, DAKO) - 7 min.,
14. płukanie w wodzie bieżącej - 10 min.,
15. płukanie w wodzie destylowanej - 10 min.,
16. odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 85%, 90%, 95%, 2x100%) i ksylenie,
17. zamknięcie preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego i szkiełek nakrywkowych.

Większość stosowanych w pracy swoistych przeciwciał wymagała dodatkowego odsłaniania determinant antygenowych poprzez użycie kuchenki mikrofalowej (anty-CD34, anty-CD31, anty-CD105, anty-CD54, anty-kolagen IV) lub wstępnego trawienia proteinazą K (PK, DAKO) (anty-laminina, anty-VEGF). W pierwszej procedurze, po odparafinowaniu i nawodnieniu preparaty gotowano dodatkowo w 10mM buforze cytrynianowym w kuchence mikrofalowej o mocy 700W przez 18 min., w przypadku stosowania PK - trawienie skrawków trwało 10 min. w temperaturze pokojowej.

Wstępne procedury przygotowania preparatów histologicznych, barwienie metodą H+E oraz badania immunocytochemiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Maciej Zabel).

## **2.5. Ocena ekspresji markerów**

### **2.5.1. Rejestracja komputerowa obrazów mikroskopowych preparatów grupy badanej (CP), kontroli negatywnej (K1) oraz kontroli pozytywnej (K2)**

Preparaty histologiczne uzyskane z zastosowaniem metody immunocytochemicznej ABC na wykrywanie danego białka antygenowego naczyń krwionośnych w trzech badanych grupach pacjentów (CP, K1 i K2) oglądano w mikroskopie optycznym Olympus B-2 z wbudowaną kamerą cyfrową Nikon Digital Sight DS-U1. Rejestrowano i archiwizowano kolorowe obrazy mikroskopowe w powiększeniu obiektywu 40x (co najmniej 10 pól z każdego preparatu z reakcją immunocytochemiczną) na obecność danego markera tj. w przypadku dziesiątka pacjentów grupy CP i K1 - co najmniej 5 pól (obrazów) z naczyniami typu HEV i 5 z naczyniami typowymi („zwykłymi”), a w przypadku grupy kontrolnej pozytywnej (K2) – 10 pól mikroskopowych z obecnością naczyń HEV. Obrazy o wielkości 2560x1920 pikseli

zapisywano w programie komputerowym LUCIA Image 5\_0. Archiwizowano je w odpowiednich folderach w formacie jpg. na dysku twardym komputera. Rejestracji całej dokumentacji fotograficznej dokonano w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

W przypadku immunocytochemicznego wykrywania markerów naczyniowych wykonano łącznie ok. 4000 obrazów mikroskopowych, z których ostatecznej analizie morfometrycznej poddano 3506 obrazów.

### 2.5.2. Analiza morfometryczna

Analizę morfometryczną prowadzono na uprzednio zarejestrowanych kolorowych obrazach mikroskopowych z pozytywną reakcją immunocytochemiczną na obecność markerów naczyniowych. Analiza ta została wykonana dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (kierownik: prof. dr hab. med. Elżbieta Kaczmarek) z zastosowaniem metody opartej na wizualizacji przestrzennej markerów na obrazach mikroskopowych, opracowanej i wdrażanej do programu komputerowego A4D zaprogramowanego w języku C++ przez Strzelczyka [83]. Zastosowanie metodyki wizualizacji przestrzennej do obrazów mikroskopowych spowodowało zmianę płaskiego obrazu na trójwymiarowy z wykorzystaniem jego jasności jako trzeciej współrzędnej (współrzędnej przestrzennej).

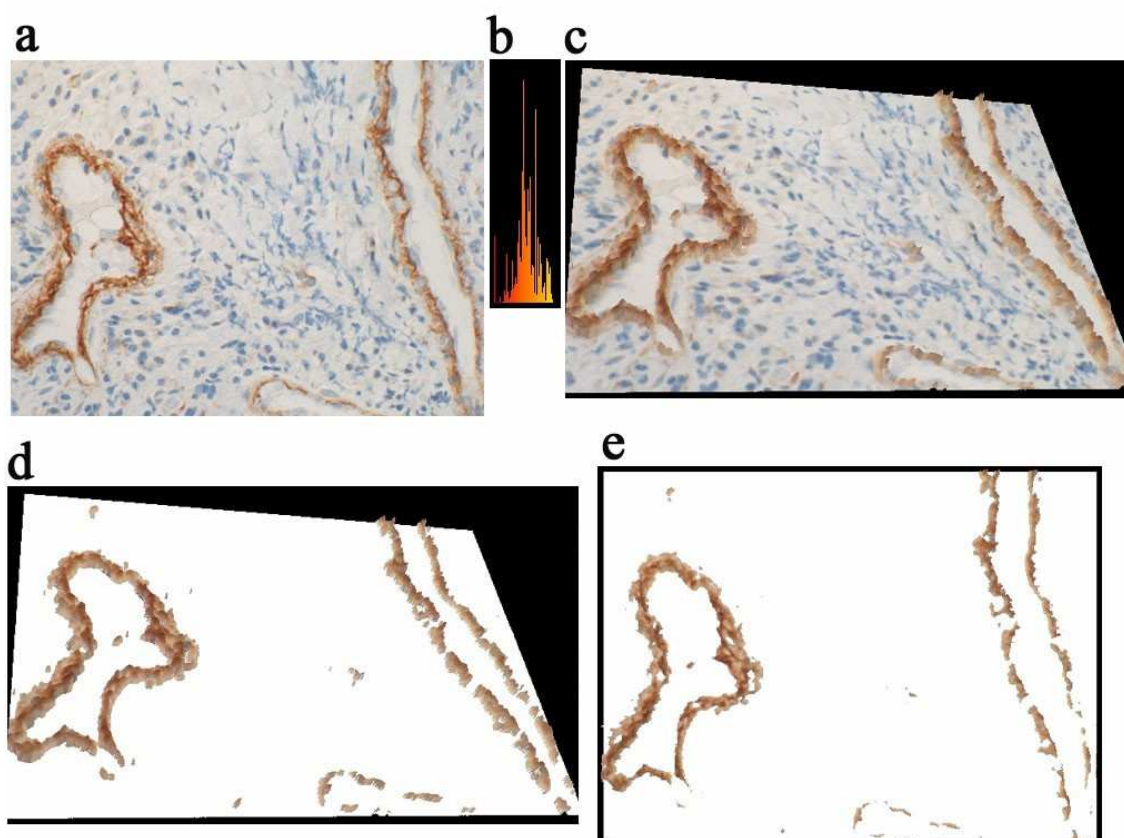
Otrzymane w ten sposób obrazy poddano filtracji w celu pozostawienia badanej reakcji markera oraz usunięcia do poziomu tła pozostałych elementów (Rycina 2). Stosowano trzy filtry:

- **filtr jasności**, wybierający te elementy obrazu, których poziom jasności nie przekracza wyznaczonej wartości progowej z histogramu jasności, charakterystycznej dla analizowanej reakcji,
- **filtr barwny**, w którym barwa zakodowana jest jako kąt o wartości od 0-360 stopni, zmieniając się od barwy czerwonej poprzez zieloną i niebieską, ponownie do czerwieni. Filtr ten pozwala na wydzielenie z obrazu barwnej reakcji w odpowiednim kolorze, który jest mieszaniną trzech podstawowych kolorów w przetwarzaniu obrazów: czerwonego, zielonego i niebieskiego (ang. *red, green, blue, RGB*),
- **filtr nasycenia**, który pozwala usunąć szare tło z obrazów kolorowych. Filtry te nie zmieniają zawartości oryginalnego obrazu, lecz jedynie maskują niepotrzebne elementy, takie jak artefakty powstałe na preparacie mikroskopowym. Dodatkowo za pomocą filtru wygładzającego (medianowego) zostały usunięte szумы charakterystyczne dla cyfrowych przetworników CCD używanych w kamerze do rejestracji obrazów mikroskopowych,

Na obrazach przetworzonych w opisany wyżej sposób program wyznaczał:

1. pole powierzchni reakcji immunocytochemicznej u każdego pacjenta z grupy CP, K1 i K2,
2. pole reakcji immunocytochemicznej markera w naczyniach krwionośnych HEV oraz w typowych (zwykłych) naczyniach dziąsła, przypadające na pole powierzchni blaszki właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) u każdego pacjenta,
3. wyniki pomiarów wykonanych w punktach 1 – 2 dzielono przez łączne pole widzenia obrazów dla każdego pacjenta i wyrażono w procentach.

Błąd metody pomiaru ekspresji reakcji immunocytochemicznej szacowano na podstawie wartości błędu standardowego różnic między pomiarami wykonanymi na tych samych obrazach mikroskopowych, ale dwoma różnymi technikami (A4D i ImageJ – <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Błąd standardowy średniej wartości pomiarów wynosi 97 pikseli, co stanowi 0,97% wartości średniego pola powierzchni ekspresji reakcji wyznaczonego metodą wizualizacji przestrzennej. Można więc przyjąć, że błąd metody nie przekracza 1%.



**Rycina 2.** Okna robocze programu A4D. Segmentacja progowa barwnej reakcji immunocytochemicznej (brązowy kolor) na przykładzie ekspresji kolagenu IV w żyłkach z wysokim śródbłonkiem (HEV) u pacjenta z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

**a** - obraz uzyskany w mikroskopie świetlnym połączonym z kamerą cyfrową; powiększenie obiektywu 40x; technika ABC; podbarwienie jąder komórkowych hematoksyliną

**b** - histogram barw składających się na odcienie brązowego koloru kolagenu IV

**c** - „uprzestrzennienie” płaskiego obrazu mikroskopowego (**a**)

**d** - wyodrębnienie (segmentacja) kolagenu IV z przestrzennego obrazu (**c**)

**e** - projekcja „uprzestrzennionej” reakcji na płaszczyznę, jako ostateczny wynik automatycznej segmentacji kolagenu IV do pomiaru jego powierzchni oraz udziału procentowego przypadającego na całe badane pole widzenia

## 2.6. Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano dzięki współpracy z Zakładem Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Katedry Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

W pierwszym etapie analizy statystycznej weryfikowano zgodność wszystkich uzyskanych wyników z rozkładem Gauss’a za pomocą testu Shapiro-Wilka. Za pomocą testu Levene’a



wykazano równość wariancji dla trzech pierwszych parametrów, dlatego dla porównań użyto testu t. Następnie obliczono parametry statystyki opisowej (średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę oraz wartość minimalną i maksymalną). Wyniki badań morfometrycznych porównywano w grupie badanej (pacjenci CP) i w dwóch grupach kontrolnych (K i K2) (próby niepowiązane) z zastosowaniem testu Manna-Whitneya. W przypadku prób powiązanych zastosowano test Wilcoxon. Korelację rang Spearmana zastosowano do badania zależności między zmiennymi. Testem nieparametrycznym Kruskala – Wallisa porównywano w grupie CP ekspresję poszczególnych markerów w zależności od CAL. Jako zależność bądź różnicę statystycznie znaczącą przyjęto wyniki na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ . Podczas analiz statystycznych korzystano z programu Statistica PL v. 8.0.

## **2.7. Zagadnienia etyczne**

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (282/08) z dnia 6 marca 2008 roku.

## V. WYNIKI

### 1. Analiza wybranych danych epidemiologicznych i klinicznych

#### 1.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

Badania dotyczyły 40 pacjentów (23 kobiet i 17 mężczyzn) z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP). Średnia wieku całej badanej grupy pacjentów z CP wynosiła  $43 \pm 11$  lat. Nie było różnic statystycznie istotnych pomiędzy wiekiem kobiet i mężczyzn z tym schorzeniem (kobiety  $45 \pm 12$  lat vs. mężczyźni  $41 \pm 10$  lat) ( $p=0,3707$ ) (Tabela 2). Postać uogólnioną przewlekłego zapalenia przyzębia stwierdzono u 22/40 pacjentów, postać zlokalizowaną u 18/40 pacjentów. Starsi byli pacjenci z uogólnioną postacią choroby ( $47 \pm 9$  lat) w porównaniu z tymi z postacią zlokalizowaną schorzenia ( $38 \pm 12$  lat) ( $p=0,0076$ ) (Tabela 2).

Badanie histopatologiczne oraz immunocytochemiczne badanie ekspresji markerów naczyniowych wykonano w sumie na 66 wycinkach dziąsła pobranych od 40 pacjentów z CP. Najwięcej preparatów dziąseł pochodziło od pacjentów z najbardziej nasilonymi zmianami zapalnymi (*grading* 3) ( $n=41$ ). Średnio nasilone zmiany zapalne obserwowano w 21 przypadkach, a słabo nasilone w 4. W grupie pacjentów z CP nie obserwowano dziąseł bez nacieków zapalnych (*grading* 0). Średnie nasilenie zmian zapalnych w dziąsłach pacjentów z CP w skali półilościowej wynosiło  $2,56 \pm 0,61$  i było istotnie wyższe niż *grading* w dziąsłach pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem ( $0,60 \pm 0,63$ ) ( $p=0,0001$ ).

W grupie pacjentów z CP najczęściej przebadanych fragmentów dziąseł charakteryzowało się klinicznie najwyższą wartością klinicznego poziomu/utruty przyczepu (CAL 3) (48/66 – 73%).

Charakterystykę grupy badanej (pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia) z wybranymi danymi klinicznymi: wiek chorych, okolice zębów z których pobierano materiał, postać schorzenia (uogólniona/zlokalizowana), wartości parametru CAL oraz histologiczną ocenę nasilenia zmian zapalnych (*grading*), przedstawiono w Tabeli 3.

Średni wiek pacjentów w grupie badanej (CP) oraz w grupach kontrolnych (K1 i K2) przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 2.** Wybrane dane kliniczne i epidemiologiczne pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

	Pacjenci (n=40)
–	
Płeć (M/K)	17/23
Wiek całej grupy pacjentów (lata)	43±11
Wiek kobiet z CP (lata)	45±11
Wiek mężczyzn z CP (lata)	41±10*
Wiek pacjentów z uogólnioną postacią CP (lata)	47±9
Wiek pacjentów ze zlokalizowaną postacią CP (lata)	38±12**

–  
**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości średnich±SD; SD – odchylenie standardowe; \* - p=0,3707 pomiędzy kobietami i mężczyznami z CP; \*\* - p=0,0076 pomiędzy pacjentami z postacią zlokalizowaną a uogólnioną CP

**Tabela 3.** Wybrane dane kliniczne i ocena półilościowa nasilenia zmian zapalnych dziąsła (*grading*) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Pacjent	Wiek (w latach)	Płeć	Okolica zęba	CAL	Grading*	Postać CP
1.	47	M	12	III	3	uogólniona
2.	52	K	31	III	1	zlokalizowana
			41	III	1	
3.	47	M	22	II	3	uogólniona
			11	III	3	
			33	III	3	
			41	III	3	
4.	49	K	31	III	3	uogólniona
			41	III	2	
5.	20	K	22	I	2	zlokalizowana
			11	II	2	
			13	II	2	
6.	49	M	31	III	3	zlokalizowana
			33	I	3	
			41	III	3	
7.	63	K	44	I	2	uogólniona
			43	III	3	
			42	III	2	
			33	III	2	
8.	58	K	43	III	3	zlokalizowana
			45	II	2	
9.	58	M	24	III	1	uogólniona
10.	47	M	11	III	3	uogólniona
			12	III	3	
			22	III	2	
11.	53	K	22	III	3	uogólniona
12.	54	K	13	III	3	uogólniona
			14	III	3	
13.	56	M	11	III	2	uogólniona
14.	27	M	15	I	3	uogólniona
15.	32	M	33	II	3	zlokalizowana
			42	II	3	
16.	43	K	21	II	2	uogólniona
			25	III	3	
			27	III	3	
17.	59	K	17	II	2	zlokalizowana
18.	43	M	11	III	3	zlokalizowana
			15	III	3	
			23	I	2	
19.	47	K	31	III	2	uogólniona
			41	III	3	
20.	39	K	31	II	3	zlokalizowana
			42	III	2	
21.	50	K	12	III	2	uogólniona
22.	53	K	31	III	3	zlokalizowana
			41	III	2	
23.	28	M	12	III	3	zlokalizowana
24.	21	K	31	III	3	zlokalizowana
25.	51	M	34	III	3	uogólniona
26.	38	K	11	III	3	uogólniona
27.	20	M	31	III	3	zlokalizowana
28.	55	M	21	III	3	uogólniona
29.	30	K	11	III	3	zlokalizowana
			13	II	3	
30.	44	K	21	III	3	zlokalizowana

31.	58	K	41	I	2	uogólniona
			43	III	3	
32.	41	K	13	III	2	uogólniona
33.	34	K	23	III	3	zlokalizowana
34.	39	M	21	III	3	zlokalizowana
35.	39	M	21	III	2	zlokalizowana
36.	40	K	13	III	3	uogólniona
37.	51	M	16	I	1	uogólniona
38.	43	K	23	II	3	uogólniona
39.	38	K	24	III	2	zlokalizowana
40.	43	M	42	III	3	uogólniona

**Objaśnienia:** nb – nie badano; K – kobieta; M – mężczyzna; CAL I: ≤3mm, CAL II: 4-6mm, CAL III: ≥7mm, \*- nasilenie zmian zapalnych (*grading*) w 4-punktowej skali półilościowej (Materiał i Metody)

## 1.2. Pacjenci z klinicznie zdrowym przyzęciem (grupa K1)

Grupa kontrolna negatywna (K1) obejmowała 15 pacjentów (10 kobiet i 5 mężczyzn). Średnia wieku tej grupy wynosiła 26±13 lat (Tabela 4).

**Tabela 4.** Porównanie wieku badanych grup pacjentów.

Grupa	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD
CP	40	43,30	20,00	63,00	11,07
K1	15	26,13*	14,00	65,00	13,56
K2	7	50,43**	46,00	55,00	3,15

**Objaśnienia:** CP- przewlekłe zapalenie przyzębia; K1 - grupa kontrolna 1 – pacjenci ze „zdrowym” przyzęciem”; K2 – grupa kontrolna 2 – pacjenci z odczynowymi węzłami chłonnyymi; n – liczba pacjentów;

\* - p=0,0001 pomiędzy CP i K1, \*\* - p=0,0005 pomiędzy K1 i K2

Wybrane dane epidemiologiczne, kliniczne oraz ocenę nasilenia zmian zapalnych (*grading*) u pacjentów z tej grupy przedstawiono w Tabeli 5. Jak z niej wynika, w dziąsłach kontrolnych w większości przypadków nie było widocznych nacieków zapalnych (*grading* 0) lub obserwowano słabe nasilenie zmian zapalnych (*grading* 1). Jedynie jeden pacjent z tej grupy miał ogniskowo większy naciek zapalny (*grading* 2).

**Tabela 5.** Wybrane dane kliniczne oraz ocena histologiczna zmian u pacjentów ze zdrowym przyzęciem (kontrola negatywna, K1).

Pacjent	Wiek (w latach)	Płeć	Okolica zęba	Grading*
1.	29	K	18	1
2.	15	M	12	1
3.	24	K	14	2
4.	65	M	32	1
5.	25	K	38	0
6.	36	K	27	0
7.	24	K	23	0
8.	28	M	47	1
9.	23	K	38	1
10.	16	M	11	1
11.	16	K	11	1
12.	15	M	48	0
13.	19	K	25	0
14.	14	K	13	0
15.	43	K	24	0

**Objaśnienia:** K- kobieta; M – mężczyzna; \*- nasilenie zmian zapalnych (*grading*) w 4-punktowej skali półilościowej (Materiał i Metody)

### 1.3. Grupa kontrolna pozytywna (grupa K2)

Grupę kontrolną pozytywną (K2) dla badania ekspresji markerów naczyń typu HEV stanowiły fragmenty odczynowych węzłów chłonnych (towarzyszące narządowym zmianom zapalnym bądź nowotworowym) (n=7). W grupie tej dominowali mężczyźni (n=6). Średnia wieku pacjentów z grupy kontrolnej pozytywnej wynosiła 50±3 lat (Tabela 4).

## **2. Histologiczna ocena naczyń krwionośnych dziąsła badanych grup pacjentów w rutynowym barwieniu hematoksyliną i eozyną**

### **2.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (grupa badana, CP).**

W dziąsłach pacjentów z CP obserwowano rozplem małych naczyń krwionośnych różnego typu (głównie włosniczki i żyłki). Drobne naczynia krwionośne i ich pętle występowały często tuż pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej (Fot. 1 A i B).

Cechą charakterystyczną było występowanie zróżnicowanej indywidualnie, ale powtarzalnej cechy – żyłek pozawłosowatych o wyglądzie naczyń typu HEV, obserwowanych w odczynowych węzłach chłonnych. Naczynia typu HEV rozmieszczone były bez wyraźnie określonej topografii, niekiedy już pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej. Z reguły naczynia te towarzyszyły bardziej nasilonym naciekom zapalnym, zbudowanym głównie z limfocytów (Fot. 1C i D). W budowie morfologicznej tych naczyń zwracała uwagę obecność komórek śródbłonka o kształcie sześciennym, z wyraźnym jądrem komórkowym i zazwyczaj jednym jąderkiem (Fot. 1 C i D). Światło naczyń wypełniały erytrocyty oraz liczne leukocyty. Wśród leukocytów najliczniejsze były neutrofile, a jedynie pojedyncze limfocyty (Fot. 1E-G).

### **2.2. Pacjenci ze zdrowym „przyzęciem” (grupa kontrolna 1, K1)**

W dziąsłach pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem obserwowano liczne, prawidłowe w swej strukturze histologicznej, typowe dla blaszki właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) dziąsła naczynia krwionośne. Przeważały naczynia włosowate i żyłki. Obserwowano pętle naczyń także tuż pod nabłonkiem dziąsła (Fot. 2 A i B). Występowały jedynie pojedyncze tętniczki. Pojedyncze żyłki pozawłosowate typu HEV występowały u dwóch pacjentów.

### **2.3. Pacjenci z odczynowymi węzłami chłonnymi (grupa kontrolna 2, K2)**

W tkance limfoidalnej odczynowych węzłów chłonnych głównymi naczyniami krwionośnymi były żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem (HEV). Jądra komórek *endothelium* charakteryzowały się z reguły sześciennym lub walcowatym kształtem, z widocznym jądrem (jąderkami) i małą ilością jasnej cytoplazmy. W świetle naczyń lub pomiędzy komórkami śródbłonka naczyń widoczne były niekiedy liczne leukocyty, z przewagą limfocytów (Fot. 2C i D). Błona podstawna HEV była z reguły pogrubiała. Naczyniom HEV towarzyszyły liczne nacieki zapalne zbudowane z komórek jednojądrzastych.

### **3. Immunocytochemiczne wykrywanie markerów naczyń krwionośnych w badanych grupach pacjentów**

#### ***MARKERY BŁONOWE endothelium***

##### **3.1. Ekspresja komórkowa cząsteczki CD34**

###### **3.1.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)**

Obserwowano z reguły intensywną ekspresję błonową cząsteczki CD34 widoczną na błonach komórkowych śródbłonna niemalże wszystkich naczyń w ocenianym wycinku tkanek dziąsła i to niezależnie od rodzaju i średnicy naczyń krwionośnych dziąsła: naczyń typowe (zwykłe) (Fot. 3A-C) i żyłki HEV (Fot. 3D-F). W żyłkach z wysokim śródbłonkiem szczególnie wyraźna reakcja immunocytochemiczna widoczna była na luminalnej części błony komórkowej prawie wszystkich komórek *endothelium* naczyń (Fot. 3E i F).

###### **3.1.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzęciem (grupa K1)**

W dziąsłach pacjentów tej grupy ekspresja immunocytochemiczna CD34 również dotyczyła wszystkich naczyń krwionośnych, z przewagą żyłek i naczyń włosowatych, obecnych szczególnie licznie pod nabłonkiem wielowarstwowym płaskim (Fot. 3G). Nieco słabszą reakcją immunocytochemiczną na obecność tego markera obserwowano w pojedynczych HEC i w pojedynczych naczyniach typu HEV u 2/15 pacjentów tej grupy (Fot. 3H).

###### **3.1.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

Obecność cząsteczki CD34 obserwowano na komórkach śródbłonna naczyń w każdym przypadku badanych tkanek z odczynowych węzłów chłonnych. Reakcja była wyraźna, obecna podobnie jak w innych badanych grupach pacjentów, szczególnie silnie na części luminalnej błony komórkowej wysokiego śródbłonna (Fot. 3I). Nasilenie reakcji immunocytochemicznej wahało się od słabego do intensywnego.

##### **3.2. Ekspresja komórkowa PECAM-1 (CD31)**

###### **3.2.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)**

Ekspresja CD31 występowała na błonach komórkowych *endothelium* typowych naczyń krwionośnych dziąsła (Fot. 4A i B), szczególnie intensywna na powierzchni zwróconej do światła naczyń. Na podstawie analizy obrazów mikroskopowych wydaje się, że w typowych naczyniach dziąsła ekspresja CD31 była słabsza w porównaniu z HEV. W HEV natomiast pozytywną reakcję obserwowano głównie w bocznych częściach błon komórkowych (Fot. 4 C i D). Ekspresję tego markera obserwowano także na błonach komórkowych nielicznych limfocytów, makrofagów i pojedynczych neutrofilów w



naciekach zapalnych w *lamina propria*, nieraz dość licznych w otoczeniu naczyń krwionośnych różnego kalibru (Fot. 4C).

### **3.2.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (grupa K1)**

Podobnie jak CD34, obecność PECAM-1 (CD31) wykazano na błonach komórek śródbłonka naczyń obecnych w danym wycinku dziąsła (Fot. 4E). Dominowało słabe nasilenie reakcji immunocytochemicznej na to białko, choć obserwowano także fragmenty dziąsła z wyraźną reakcją immunocytochemiczną (Fot. 4E).

### **3.2.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

W naczyniach HEV tej grupy pacjentów obserwowano zróżnicowaną reakcję na ten antygen błonowy, od słabszej (Fot. 4D) do bardzo intensywnej do reakcji immunocytochemicznej (Fot. 4F), obejmującej luminalne i boczne fragmenty błon komórkowych śródbłonka naczyń.

## **3.3. Ekspresja komórkowa endogliny (CD105)**

### **3.3.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia**

Ekspresja komórkowa CD105 dotyczyła głównie błon komórkowych, ale także cytoplazmy komórek śródbłonka typowych naczyń krwionośnych dziąsła (Fot. 5A) oraz naczyń typu HEV (Fot. 5B-D). Niekiedy obserwowano bardzo intensywną reakcję immunocytochemiczną na to białko, pozwalającą na dokładne uwidocznienie sześciennego kształtu komórek wysokiego śródbłonka w przypadku żyłek postkapilarnych (Fot. 5B). W naczyniach „zwykłych”, również wyraźnie widoczne były komórki *endothelium* naczyń, wyściełające błonę wewnętrzną naczyń (Fot. 5A).

### **3.3.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (grupa K1)**

Komórkowa ekspresja CD105 w wycinkach dziąseł kontrolnych również „znakowała” komórki śródbłonka tych naczyń, z widocznym rąbkiem cytoplazmy i błoną komórkową. Niekiedy obserwowano słabe nasilenie reakcji immunocytochemicznej (Fot. 5E i F).

### **3.3.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

W preparatach histologicznych tej grupy pacjentów ekspresja CD105 również obecna była głównie na błonach komórkowych, choć także w cytoplazmie pojedynczych komórek *endothelium* HEV. Niekiedy obserwowano pozytywną reakcję także w cytoplazmie (i błonach) pojedynczych limfocytów, towarzyszących typowym HEV w mięszu narządu (Fot. 5G i H).

### **3.4. Ekspresja komórkowa ICAM-1 (CD54)**

#### **3.4.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia**

Immunocytochemiczną reakcję na ICAM-1 lokalizowano głównie na błonach komórkowych *endothelium* naczyń niezależnie od morfologicznej budowy naczynia krwionośnego dziąsła (Fot. 6A-C). W naczyniach typowych obserwowano nieraz jedynie delikatną pozytywną reakcję immunocytochemiczną, z obecnością także pojedynczych immunonegatywnych komórek *endothelium* (Fot. 6A). W przypadku naczyń typu HEV, miejscami nawet w tym samym naczyniu, obserwowano jedynie pojedyncze komórki *endothelium* z widoczną pozytywną reakcją na CD54 (Fot. 6C). Rzadziej ekspresję CD54 wykrywano w komórkach nacieku zapalnego (głównie w limfocytach). W naczyniach HEV wyraźniejsza była powierzchniowa ekspresja ICAM-1, obecna niekiedy również w bocznych częściach błon komórkowych.

#### **3.4.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (grupa K1)**

W naczyniach dziąseł kontrolnych naczyniowa ekspresja ICAM-1 dotyczyła podobnie, jak w grupie badanej, także komórek *endothelium* i obserwowano niekiedy wyraźniejszą pozytywną reakcję na błonach komórkowych mikronaczyń w porównaniu z cytoplazmą (Fot. 6D).

#### **3.4.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

Ekspresja ICAM-1 w typowych HEV odczynowych węzłów chłonnych dotyczyła przede wszystkim błon komórkowych, części zwróconej do światła naczynia. Dominowało niezbyt intensywne nasilenie reakcji immunocytochemicznej na ten marker (Fot. 6E i F). Sporadycznie ujawniano ekspresję ICAM-1 również na pojedynczych komórkach nacieków zapalnych (limfocyty, monocyty) widocznych w sąsiedztwie HEV (Fot. 6F).

### ***MARKERY BŁONY PODSTAWNEJ endothelium***

### **3.5. Ekspresja komórkowa kolagenu IV**

#### **3.5.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)**

Słabsza pozytywna reakcja na to białko lokalizowała się w błonach podstawnych śródbłonna typowych naczyń krwionośnych dziąsła (Fot. 7A) oraz wyraźniejsza była w naczyniach typu HEV (Fot. 7B-D). Ekspresja immunocytochemiczna była wyraźna, choć dostrzegano także wycinki dziąseł z naczyniami pozbawionymi ekspresji kolagenu IV lub ze śladową ilością tego markera w okolicy błony podstawnej *endothelium* (Fot. 7D). Słabą reakcję immunocytochemiczną obserwowano w błonie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego dziąsła lub kieszonki przyzębnej (Fot. 7B). Niekiedy obserwowano pojedyncze

formujące się komórki śródbłonka i bardzo nieliczne struktury włóknkowe z pozytywną reakcją na to białko rozproszone w tkance łącznej *lamina propria* dziąsła (Fot. 7C i D).

### **3.5.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (grupa K1)**

W prawidłowych naczyniach krwionośnych dziąseł pacjentów ze „zdrowym” przyzębiem ekspresja kolagenu IV była słaba i dotyczyła również błon podstawnych komórek śródbłonka tych naczyń. Nie zawsze obecna była na całym obwodzie naczynia krwionośnego (Fot. 7E). Obserwowano także pozytywną reakcję na to białko w błonie podstawnej nabłonka dziąsłowego (Fot. 7E).

### **3.5.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

Obserwowano bardzo wyraźny odczyn immunocytochemiczny na to białko w przypadku HEV odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2) (Fot. 7F i G). Ekspresja kolagenu IV dotyczyła z reguły całego obwodu błony podstawnej komórek śródbłonka danej żyłki pozawłosowatej z wysokim śródbłonkiem. Obserwowano również pojedyncze lub wyraźne struktury włóknkowe i/lub komórki siateczki z pozytywną reakcją na to białko rozproszone w tkance łącznej siateczkowej węzła chłonnego (Fot. 7G).

## **3.6. Ekspresja komórkowa lamininy**

### **3.6.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)**

U pacjentów z CP ekspresja dziąsłowa lamininy była bardzo wyraźna i dotyczyła podobnie jak w przypadku kolagenu typu IV, błon podstawnych komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i to niezależnie od typu histologicznego naczynia. W naczyniach zwykłych dziąsła silną reakcję obserwowano na całym zewnętrznym obwodzie naczynia krwionośnego (Fot. 8A). Nasilenie reakcji w przypadku indywidualnych naczyń było silniejsze niż w przypadku kolagenu IV (Fot. 8B). Niekiedy białko to wyraźnie „opłatało” komórki *endothelium* naczynia krwionośnego od strony zewnętrznej (Fot. 8B-D). Reakcja pozytywna uwidaczniała także błony podstawne nabłonka kieszonki przyzębnej (Fot. 8C i D).

### **3.6.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (grupa K1)**

W tej grupie pacjentów, pozytywna reakcja na lamininę dotyczyła większości błon podstawnych naczyń krwionośnych obecnych w wycinku tkanki dziąsła. Reakcja była z reguły intensywna (Fot. 8E), porównywalna pod względem nasilenia ze spotykaną w innych grupach pacjentów badanych w tej pracy. Pozytywna reakcja na lamininę obserwowana była także w przypadku błony podstawnej typowego nabłonka dziąsła (Fot. 8E).

### **3.6.3. Naczynia HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)**

Laminina ulegała zróżnicowanej ekspresji, od bardzo silnej do słabej (Fot. 8F-H). Dotyczyła zarówno błon podstawnych komórek *endothelium* (niekiedy dość pogrubianych) HEV (Fot.

8H), jak i włókien siateczkowych rozproszonych w strukturach odczynowego węzła chłonного.

### **CZYNNIKI WZROSTU *endothelium***

#### **3.7. Ekspresja komórkowa VEGF**

Przeciwciała stosowane w obecnej pracy do wykrywania tego czynnika wzrostu komórek śródbłonna naczyń, służyły do lokalizacji trzech izoform tego białka (VEGF-A, VEGF-B oraz VEGF-C). W porównawczej analizie ilościowej przedstawiono wyniki ekspresji VEGF obecnej wyłącznie w obszarze *lamina propria* (komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, komórki nacieków zapalnych), a nie w obszarze nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej. W badanych grupach pacjentów ekspresja VEGF najlepiej była wyrażona w komórkach nacieków zapalnych (limfocyty, makrofagi), obecnych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Wykazywano zarówno nieliczne, pojedyncze VEGF-pozytywne komórki (makrofagi, monocyty) (Fot. 9A), jak i liczniejsze immunopozytywne komórki w naciekach zapalnych (Fot. 9B-D).

U pacjentów z CP jedynie pojedyncze komórki śródbłonna naczyń wykazywały pozytywną reakcję na ten czynnik wzrostowy i to prawie wyłącznie komórki śródbłonna HEV, a nie naczyń typowych. Nie obserwowano ekspresji VEGF w komórkach nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej.

W przypadku wycinków dziąseł z grupy K1, ekspresja VEGF była znikoma i dotyczyła pojedynczych komórek typowych naczyń krwionośnych dziąsła (Fot. 9E i F).

Co ciekawe w grupie K2 nie obserwowano pozytywnej reakcji na VEGF w naczyniach HEV, a z komórek limfoidalnych, jedynie nieliczne z nich wykazywały pozytywną reakcję (Fot. 9G).

#### 4. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w HEV i w typowych naczyniach krwionośnych dżiąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia

U pacjentów z CP statystycznie istotne różnice pomiędzy ekspresją w HEV i naczyniach typowych dżiąsła dotyczyły ekspresji 4 badanych markerów naczyniowych: cząsteczki CD34, endogliny (CD105), ICAM-1 (CD54) i kolagenu typu IV, a ekspresja ta w każdym przypadku była większa w przypadku żyłek pozawłosowatych (HEV) w porównaniu z naczyniami typowymi. Jedynie ekspresja PECAM-1 i lamininy w obu tych rodzajach naczyń krwionośnych była porównywalna.

W przypadku VEGF ekspresja tego markera w HEV była istotnie niższa w porównaniu z całkowitą ekspresją w typowych naczyniach dżiąsła i komórkach nacieku zapalnego (Tabela 6).

**Tabela 6.** Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) i typowych naczyniach dżiąsła u pacjentów z CP (test Wilcoxon).

Marker (% reakcji)	Rodzaj naczynia	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p testu
CD34	HEV	57	3,42	0,00	7,61	1,61	0,0001
	typowe	57	2,65	0,00	6,26	1,19	
PECAM-1 (CD31)	HEV	25	4,58	0,16	13,07	3,72	0,7164
	typowe	26	3,94	0,42	13,56	3,31	
Endoglina (CD105)	HEV	61	1,64	0,00	6,41	1,61	0,0001
	typowe	61	1,14	0,00	6,10	1,32	
ICAM-1 (CD54)	HEV	26	1,75	0,00	6,39	1,38	0,0016
	typowe	25	1,05	0,00	3,63	0,91	
Kolagen IV	HEV	61	1,38	0,03	10,49	1,76	0,0001
	typowe	61	0,61	0,00	5,87	1,00	
Laminina	HEV	35	4,60	0,00	15,44	4,00	0,0796
	typowe	35	3,74	0,25	24,29	3,99	
VEGF	HEV	19	0,87	0,00	11,08	2,70	0,0216
	typowe i naciek zapalny	42	3,18	0,00	23,81	4,53	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dżiąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne.

## **5. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów w badanych typach naczyń dziąsła (HEV, typowe naczynia) oraz sumarycznej ekspresji antygenów naczyniowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia**

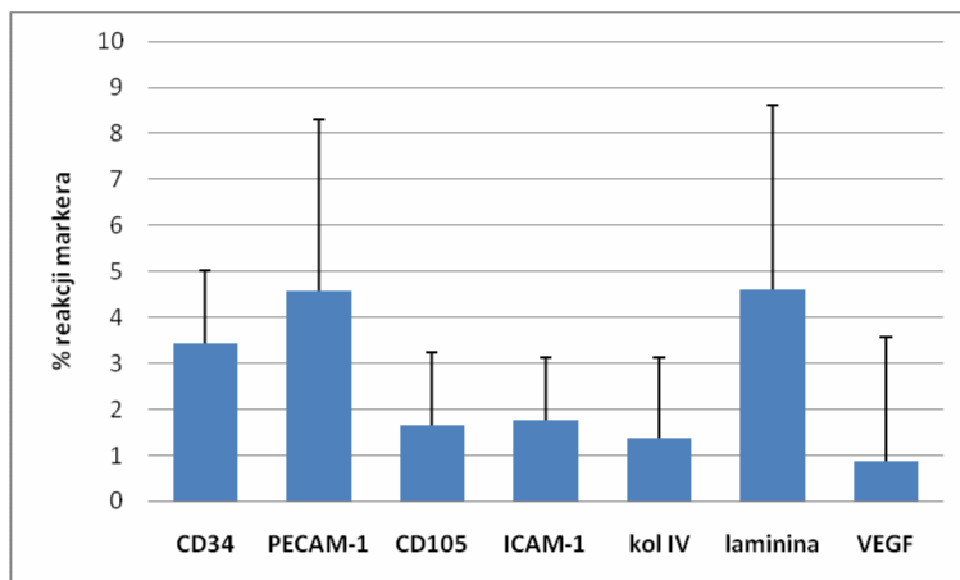
U pacjentów z CP w dziąsłowych HEV największa ekspresja dotyczyła lamininy, następnie porównywalnie z nią PECAM-1 i CD34, w dalszej kolejności zbliżone pod względem ilości były ekspresje ICAM-1, endogliny i kolagenu IV. Najniższa ekspresja w HEV dotyczyła VEGF.

Wykazano, że w dziąsłach pacjentów z CP ekspresja CD34 w HEV jest istotnie wyższa w porównaniu z ekspresją endogliny, ICAM-1, VEGF i kolagenu IV. Pozostałe różnice ilościowe w ekspresji markerów naczyniowych w żyłkach pozawłosowatych pacjentów z CP przedstawia Tabela 7 i Rycina 3.

**Tabela 7.** Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) u pacjentów z CP (test Wilcoxon).

Marker	Średnia ekspresja w HEV $\pm$ SD	Marker	Średnia ekspresja w HEV $\pm$ SD	p
CD34	3,42 $\pm$ 1,61	PECAM-1	4,58 $\pm$ 3,72	0,6702
		endoglina	1,64 $\pm$ 1,61	0,0001
		ICAM-1	1,75 $\pm$ 1,38	0,0001
		kolagen IV	1,38 $\pm$ 1,76	0,0001
		laminina	4,60 $\pm$ 4,00	0,1207
		VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0043
PECAM-1	4,58 $\pm$ 3,72	endoglina	1,64 $\pm$ 1,61	0,0140
		ICAM-1	1,75 $\pm$ 1,38	0,0001
		kolagen IV	1,38 $\pm$ 1,76	0,0033
		laminina	4,60 $\pm$ 4,00	0,4209
		VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0231
endoglina	1,64 $\pm$ 1,61	ICAM-1	1,75 $\pm$ 1,38	0,1155
		kolagen IV	1,38 $\pm$ 1,76	0,2090
		laminina	4,60 $\pm$ 4,00	0,0001
		VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0089
ICAM-1	1,75 $\pm$ 1,38	kolagen IV	1,38 $\pm$ 1,76	0,5812
		laminina	4,60 $\pm$ 4,00	0,0055
		VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0962
kolagen IV	1,38 $\pm$ 1,76	laminina	4,60 $\pm$ 4,00	0,0002
laminina	4,60 $\pm$ 4,00	VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0126
VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	VEGF	0,87 $\pm$ 2,70	0,0505

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; p – poziom istotności.



Rycina 3. Średnie wartości ekspresji antygenów naczyń krwionośnych w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Różnice statystycznie istotne pomiędzy markerami z wartościami p podano w Tabeli 7.

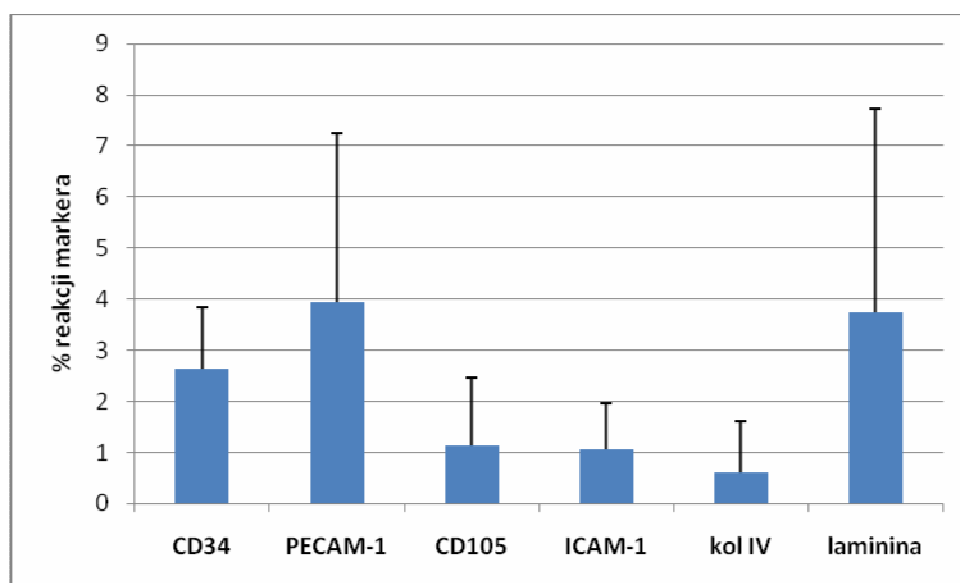
W typowych naczyniach dziąsłowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ilościowa analiza markerów wykazała, podobnie jak w naczyniach HEV – dominującą ekspresję PECAM-1 i lamininy, które nie różniły się istotnie od ekspresji CD34. Ekspresja

CD34 była większa istotnie od ekspresji endogliny, ICAM-1 i kolagenu IV (czyli podobnie jak w naczyniach HEV). Ze względu na przewagę ekspresji VEGF w komórkach nacieków zapalnych a nie w komórkach *endothelium* zwykłych naczyń dziąsła, pominięto porównanie ekspresji tego markera z innymi markerami typowych naczyń krwionośnych dziąsła. Pozostałe różnice we wzajemnej ekspresji markerów naczyń przedstawiono w Tabeli 8 i na Rycinie 4.

**Tabela 8.** Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła u pacjentów z CP (test Wilcoxon).

Marker	Średnia ekspresja w naczyniach „zwykłych” ±SD	Marker	Średnia ekspresja w naczyniach „zwykłych” ±SD	p
CD34	2,65±1,19	PECAM-1	3,94±3,31	0,2087
		endoglina	1,14±1,32	0,0001
		ICAM-1	1,05±0,91	0,0001
		kolagen IV	0,61±1,00	0,0001
		laminina	3,74±3,99	0,0879
PECAM-1	3,94±3,31	endoglina	1,14±1,32	0,0038
		ICAM-1	1,05±0,91	0,0001
		kolagen IV	0,61±1,00	0,0001
		laminina	3,74±3,99	0,9405
endoglina	1,14±1,32	ICAM-1	1,05±0,91	0,0047
		kolagen IV	0,61±1,00	0,0003
		laminina	3,74±3,99	0,0001
ICAM-1	1,05±0,91	kolagen IV	0,61±1,00	0,1005
		laminina	3,74±3,99	0,0002
kolagen IV	0,61±1,00	laminina	3,74±3,99	0,0001

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; p – poziom istotności.



Rycina 4. Średnie wartości ekspresji antygenów w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Wartości p w przypadku różnic statystycznie istotnych pomiędzy ekspresją markerów podano w Tabeli 8.

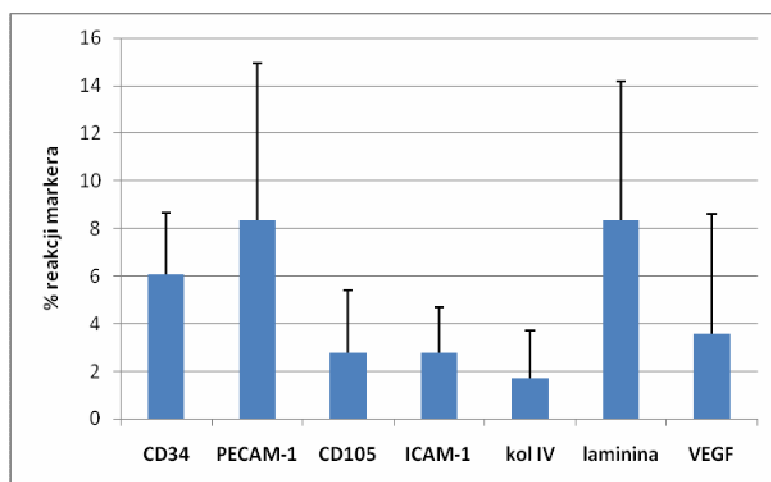


Sumaryczne wartości średniej ekspresji antygenów naczyniowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia przedstawiono na Rycinie 5 i w Tabeli 9. Z danych tych wynika, że z markerów błonowych naczyń krwionośnych największa ekspresja dotyczyła PECAM-1 i CD34, a z markerów błony podstawnej komórek śródbłonka dominowała ekspresja lamininy. Całkowita ekspresja VEGF u pacjentów z CP była istotnie niższa w porównaniu do ekspresji CD34 i lamininy.

**Tabela 9.** Porównanie wzajemnej sumarycznej ekspresji markerów naczyniowych w HEV i w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła u pacjentów z CP (test Wilcoxon).

Marker	Średnia sumaryczna ekspresja $\pm$ SD	Marker	Średnia ekspresja sumaryczna $\pm$ SD	p
CD34	6,07 $\pm$ 2,60	PECAM-1	8,34 $\pm$ 6,58	0,7317
		endoglina	2,78 $\pm$ 2,61	0,0001
		ICAM-1	2,76 $\pm$ 1,95	0,0001
		kolagen IV	1,69 $\pm$ 2,04	0,0001
		laminina	8,34 $\pm$ 5,83	0,0444
PECAM-1	8,34 $\pm$ 6,58	VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,0087
		endoglina	2,78 $\pm$ 2,61	0,0029
		ICAM-1	2,76 $\pm$ 1,95	0,0001
		kolagen IV	1,69 $\pm$ 2,04	0,0001
		laminina	8,34 $\pm$ 5,83	0,3703
endoglina	2,78 $\pm$ 2,61	VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,0792
		ICAM-1	2,76 $\pm$ 1,95	0,0138
		kolagen IV	1,69 $\pm$ 2,04	0,0004
		laminina	8,34 $\pm$ 5,83	0,0001
ICAM-1	2,76 $\pm$ 1,95	VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,8105
		kolagen IV	1,69 $\pm$ 2,04	0,2758
		laminina	8,34 $\pm$ 5,83	0,0004
kolagen IV	1,69 $\pm$ 2,04	VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,8213
		laminina	8,34 $\pm$ 5,83	0,0001
laminina	8,34 $\pm$ 5,83	VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,5578
		VEGF	3,57 $\pm$ 5,02	0,0002

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; p – poziom istotności.



Rycina 5. Średnie wartości sumarycznej ekspresji antygenów w naczyniach krwionośnych dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Wartości p w przypadku różnic statystycznie istotnych pomiędzy ekspresją markerów podano w Tabeli 9.

## **6. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych u pacjentów ze „zdrowym” przyzębiem (grupa kontrolna 1, K1)**

W przypadku grupy kontrolnej ze „zdrowym” przyzębiem, wykazano zaledwie pojedyncze żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem i to jedynie u 2/15 pacjentów. Stąd też w Tabeli 10 i na Rycinie 6 przedstawiono porównanie wzajemnej sumarycznej ekspresji markerów w naczyniach widocznych w preparatach dziąseł z grupy kontrolnej 1.

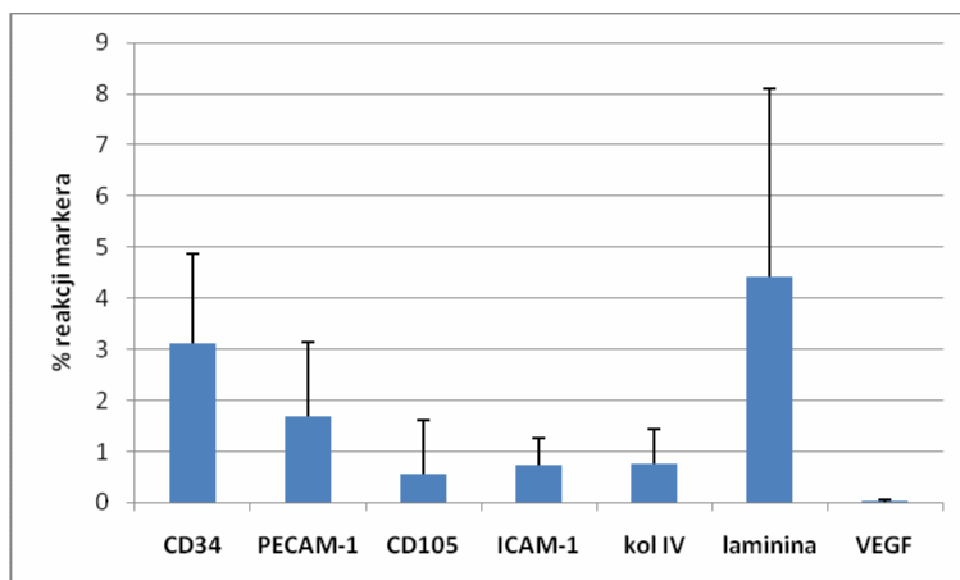
Z danych tych wynika, że w sumarycznej ekspresji antygenów błonowych dominowała ekspresja CD34 i PECAM-1, ilościowo mniej było pozostałych markerów (endogлина, ICAM-1). Nie wykazano różnic ilościowych między ekspresją kolagenu i lamininy.

Ekspresja VEGF była istotnie najniższa wśród ekspresji innych markerów, z wyjątkiem endogliny.

**Tabela 10.** Porównanie wzajemnej sumarycznej ekspresji markerów naczyniowych u pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa kontrolna 1, K1) (test Wilcoxon).

Marker	Średnia ekspresja ±SD	Marker	Średnia ekspresja ±SD	p
CD34	3,12±1,76	PECAM-1	1,68±1,47	0,1729
		endoglina	0,57±1,04	0,0012
		ICAM-1	0,74±0,53	0,0277
		kolagen IV	0,75±0,69	0,0179
		laminina	4,41±3,69	0,4989
		VEGF	0,02±0,04	0,0180
PECAM-1	1,68±1,47	endoglina	0,57±1,04	0,0277
		ICAM-1	0,74±0,53	0,0464
		kolagen IV	0,75±0,69	0,2249
		laminina	4,41±3,69	0,1158
		VEGF	0,02±0,04	0,0277
endoglina	0,57±1,04	ICAM-1	0,74±0,53	0,0464
		kolagen IV	0,75±0,69	0,2367
		laminina	4,41±3,69	0,0179
		VEGF	0,02±0,04	0,1729
ICAM-1	0,74±0,53	kolagen IV	0,75±0,69	0,6858
		laminina	4,41±3,69	0,0278
		VEGF	0,02±0,04	0,0277
kolagen IV	0,75±0,69	laminina	4,41±3,69	0,1159
		VEGF	0,02±0,04	0,0431
laminina	4,41±3,69	VEGF	0,02±0,04	0,0261

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; p – poziom istotności



Rycina 6. Średnie wartości sumarycznej ekspresji antygenów naczyń krwionośnych w dziąsłach pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa kontrolna K1). Wartości p w przypadku różnic statystycznie istotnych pomiędzy ekspresją markerów podano w Tabeli 9.

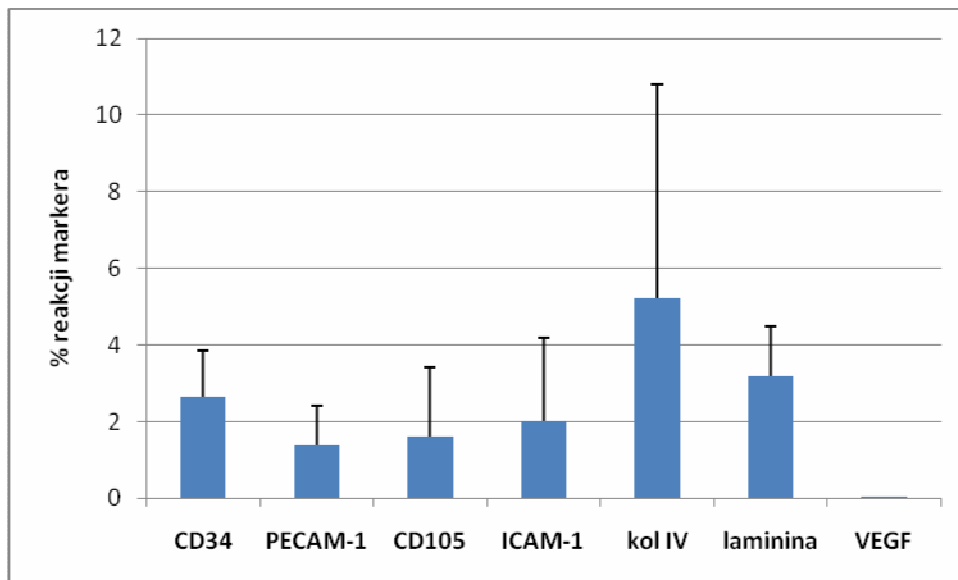
## 7. Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych w HEV u pacjentów z odczynowymi węzłami chłonnymi (grupa kontrolna 2, K2)

W przypadku grupy kontrolnej 2 w preparatach histologicznych wśród naczyń krwionośnych dominowały żyłki pozawłośniczkowe z wysokim śródbłonkiem (HEV). Tabela 11 przedstawia porównanie wzajemnej ekspresji markerów w tym typie naczyń krwionośnych. Wykazano, że istotnie najniższa ekspresja w porównaniu do wszystkich pozostałych markerów naczyniowych dotyczy VEGF. Ilościowa ekspresja pozostałych antygenów HEV w grupie K2 nie różniła się istotnie między sobą (Tabela 11, Rycina 7).

**Tabela 11.** Porównanie wzajemnej ekspresji markerów naczyniowych pacjentów HEV u pacjentów z odczynowymi zmianami w węzłach chłonnych (grupa kontrolna 2, K2) (test Wilcoxon).

Marker	Średnia ekspresja w HEV±SD	Marker	Średnia ekspresja w HEV±SD	p
CD34	2,64±1,21	PECAM-1	1,37±1,03	0,0909
		Endoglina	1,60±1,83	0,1763
		ICAM-1	2,02±2,16	0,3980
		kolagen IV	5,21±5,60	0,2367
		Laminina	3,19±1,31	0,2307
		VEGF	0,01±0,01	0,0179
PECAM-1	1,37±1,03	Endoglina	1,60±1,83	0,8658
		ICAM-1	2,02±2,16	1,0000
		kolagen IV	5,21±5,60	0,1282
		Laminina	3,19±1,31	0,1285
		VEGF	0,01±0,01	0,0179
endoglina	1,60±1,83	ICAM-1	2,02±2,16	0,6121
		kolagen IV	5,21±5,60	0,0910
		Laminina	3,19±1,31	0,0909
		VEGF	0,01±0,01	0,0279
ICAM-1	2,02±2,16	kolagen IV	5,21±5,60	0,3105
		Laminina	3,19±1,31	0,3106
		VEGF	0,01±0,01	0,0277
kolagen IV	5,21±5,60	Laminina	3,19±1,31	0,3980
		VEGF	0,01±0,01	0,0277
laminina	3,19±1,31	VEGF	0,01±0,01	0,0180

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; p – poziom istotności



Rycina 7. Średnie wartości sumarycznej ekspresji antygenów naczyń krwionośnych w odczynowych węzłach chłonnych (grupa kontrolna K2). Różnice statystycznie istotne pomiędzy markerami z wartościami p podano w Tabeli 10.

### **8. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) w zależności od płci pacjenta**

Statystycznie istotne różnice dotyczące ekspresji markerów naczyniowych w dziąsłach pacjentów z CP zbadano także biorąc pod uwagę płeć pacjentów. Jedynie w przypadku endogliny (CD105) wykazano istotnie większą ekspresję tego markera w typowych naczyniach krwionośnych w dziąsłach kobiet z CP w porównaniu z mężczyznami (kobiety:  $1,37 \pm 1,43\%$  vs. mężczyźni:  $0,82 \pm 1,11\%$ ). Nie wykazano takiej różnicy w HEV (Tabela 12).

**Tabela 12.** Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w HEV i w naczyniach krwionośnych typowych u pacjentów z CP w zależności od płci (test Manna-Whitneya).

Marker (% reakcji)	Rodzaj naczyń	Płeć	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	HEV	K	32	3,64	0,49	7,21	1,65	0,2393
		M	25	3,14	0,00	7,61	1,56	
	typowe	K	32	2,87	0,56	6,26	1,25	0,0754
		M	25	2,37	0,00	5,34	1,07	
PECAM-1	HEV	K	13	2,95	0,16	6,17	1,89	0,0868
		M	12	6,33	0,70	13,07	4,45	
	typowe	K	14	2,93	0,42	8,33	2,46	0,0950
		M	12	5,12	1,23	13,56	3,86	
Endoglina	HEV	K	35	1,92	0,00	6,41	1,64	0,0739
		M	26	1,28	0,00	5,84	1,54	
	typowe	K	35	1,37	0,00	6,10	1,43	0,0460
		M	26	0,82	0,00	4,46	1,11	
ICAM-1	HEV	K	14	2,17	0,00	6,39	1,56	0,0849
		M	12	1,27	0,26	3,63	0,98	
	typowe	K	14	1,21	0,00	3,63	0,91	0,2441
		M	11	0,85	0,08	3,10	0,92	
Kolagen IV	HEV	K	36	1,53	0,08	10,49	2,05	0,4186
		M	25	1,17	0,03	4,28	1,24	
	typowe	K	36	0,74	0,00	5,87	1,19	0,4798
		M	25	0,42	0,00	2,61	0,63	
Laminina	HEV	K	18	5,31	0,00	15,44	4,59	0,3687
		M	17	3,85	0,00	9,50	3,24	
	typowe	K	18	2,96	0,25	6,93	1,82	0,2874
		M	17	4,56	0,49	24,29	5,38	
VEGF	HEV	K	11	1,07	0,00	11,08	3,32	0,6574
		M	8	0,60	0,00	4,79	1,69	
	typowe +kom. nacieku	K	22	2,64	0,08	13,57	3,44	0,5919
		M	20	3,78	0,00	23,81	5,52	

**Objaśnienia:** K - kobiety, M - mężczyźni, p – poziom istotności; czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne

## 9. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i w grupach kontrolnych (K1 i K2)

### 9.1. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w grupie CP i K1

Porównawczą ekspresję markerów naczyniowych w przypadku grupy CP i K1 przedstawia Tabela 13. W istocie udało się porównać ekspresję markerów w typowych naczyniach dziąsła oraz sumaryczną ekspresję markerów, gdyż w grupie kontrolnej obserwowano zaledwie pojedyncze HEV i to jedynie w 2/15 przebadanych fragmentów dziąsła.

Istotnie większa była całkowita ekspresja CD34 w grupie pacjentów z CP ( $6,07 \pm 2,60\%$ ) w porównaniu z ekspresją analogicznego markera w naczyniach krwionośnych dziąsła u pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem ( $3,12 \pm 1,76\%$ ). Ekspresja PECAM-1 również dominowała w naczyniach u pacjentów z CP. Statystycznie istotne różnice dotyczyły ekspresji tego markera w naczyniach typowych i sumarycznej ekspresji tego markera, która

w obu przypadkach była wyższa u pacjentów z CP w porównaniu z analogiczną ekspresją w grupie kontrolnej K1.

W przypadku endogliny wyższe wartości ekspresji wykazano w grupie CP, a dotyczyła ona zarówno całkowitej ekspresji w obu typach naczyń, jak również ekspresji wyłącznie w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła. W przypadku ICAM-1, tylko sumaryczna ekspresja ICAM-1 była wyższa u pacjentów z CP w porównaniu z K1 (Rycina 8). Sumaryczna ekspresja kolagenu IV i lamininy nie różniła się pomiędzy porównywanymi grupami badanych pacjentów (Tabela 13).

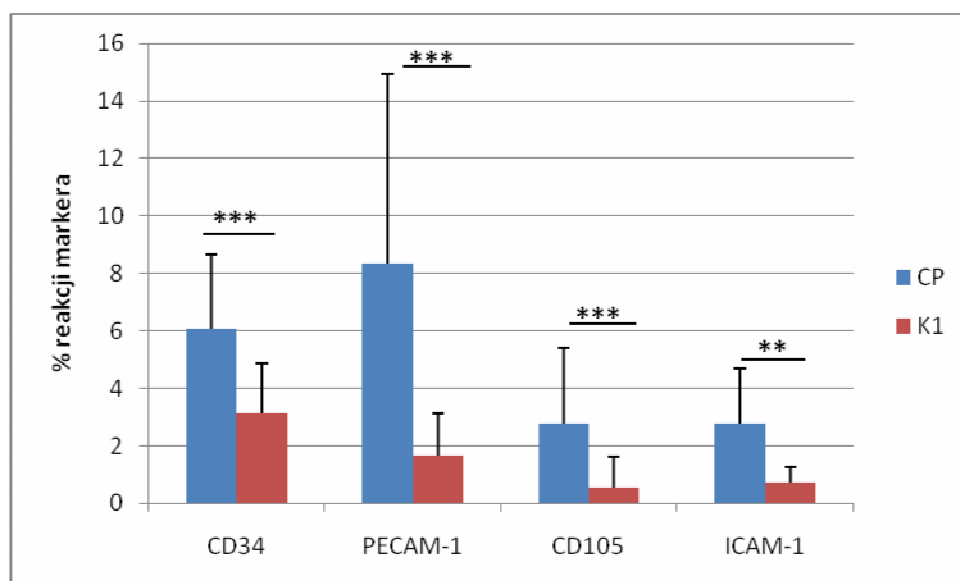
Zasadniczo nie obserwowano pozytywnej reakcji immunocytochemicznej na VEGF w przypadku nielicznych naczyń typu HEV w kontrolnych dziąsłach, stąd też nie wykazano żadnych różnic w ekspresji tego markera pomiędzy grupami.

Istotnie większą ekspresję VEGF obserwowano natomiast w przypadku typowych naczyń krwionośnych dziąsła u chorych z CP w porównaniu z analogicznymi naczyniami w dziąsłach grupy K1.

**Tabela 13.** Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i grupie kontrolnej („zdrowe” przyzębie, K1) (test Manna-Whitneya).

MARKER	Rodzaj naczynia	CP	K1	p
CD34	HEV	3,42±1,61	0,21±0,36	-*
	typowe	2,65±1,19	3,08±1,81	0,4786
	∑ HEV i typowe	6,07±2,60	3,12±1,76	0,0001
PECAM-1	HEV	4,58±3,72	1,33±1,88	-*
	typowe	3,94±3,31	1,24±0,75	0,0188
	∑ HEV i typowe	8,34±6,58	1,68±1,47	0,0018
Endoglina	HEV	1,64±1,61	0,58±1,16	-*
	typowe	1,14±1,32	0,42±0,87	0,0021
	∑ HEV i typowe	2,78±2,61	0,57±1,04	0,0001
ICAM-1	HEV	1,75±1,38	0,47±0,67	-*
	typowe	1,05±0,91	0,58±0,52	0,2271
	∑ HEV i typowe	2,76±1,95	0,74±0,53	0,0071
Kolagen IV	HEV	1,38±1,76	0,00	-*
	typowe	0,61±1,00	0,89±0,82	0,1737
	∑ HEV i typowe	1,69±2,04	0,75±0,69	0,1870
Laminina	HEV	4,60±4,00	1,50±2,12	-*
	typowe	3,74±3,99	3,98±3,86	1,0000
	∑ HEV i typowe	8,34±5,83	4,41±3,69	0,0791
VEGF	HEV	0,87±2,70	0,00	-*
	typowe+kom. nacieku	3,18±4,53	0,02±0,04	0,0001
	∑ HEV i typowe+naciek	3,57±5,02	0,02±0,04	0,0001

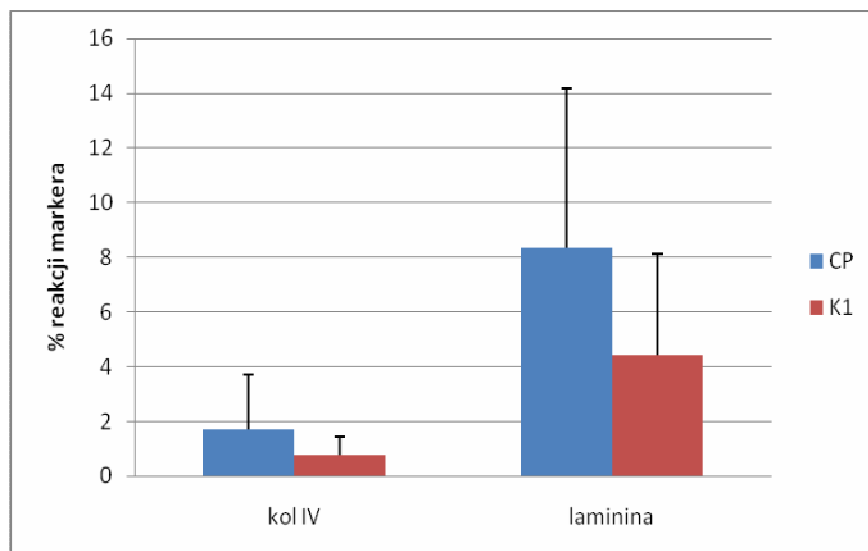
**Objaśnienia:** W Tabeli podano średnią procentową ekspresję markerów±SD; p – poziom istotności; czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego



Rycina 8. Porównanie **sumarycznej** (HEV i naczynia typowe) ekspresji **markerów błonowych** (CD34, PECAM-1, endoglina, ICAM-1) pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i kontrolą 1 (K1) (test Manna-Whitneya); \*\*\* - p<0,001; \*\* - p<0,01

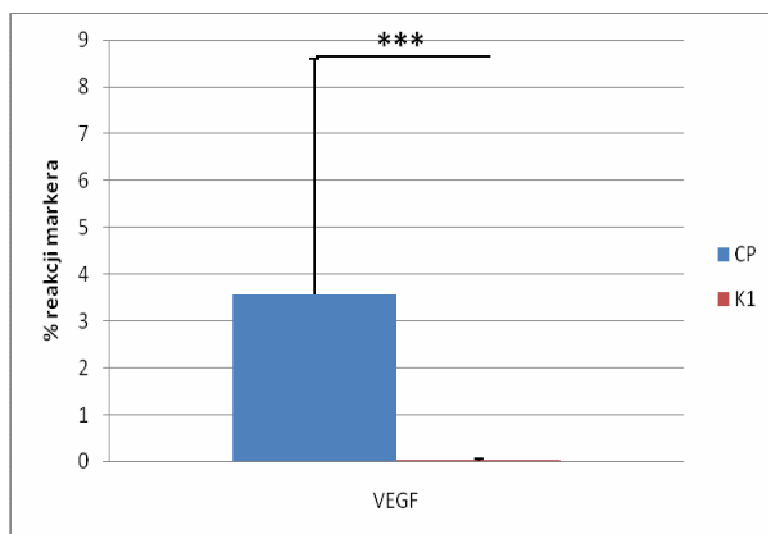


Porównanie sumarycznej ekspresji markerów błony podstawnej naczyń krwionośnych (kolagen IV oraz laminina) w dziąsłach pacjentów z CP i kontrolnych (K1) przedstawia graficznie Rycina 9. Wynika z niej, że nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją tych dwóch białek błony podstawnej w zależności od badanej grupy.



Rycina 9. Porównanie **sumarycznej** (HEV i naczynia typowe) ekspresji **markerów błony podstawnej naczyń krwionośnych** pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i kontrolą 1 (K1) (test Manna-Whitneya). Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami ( $p > 0,05$ ).

Rycina 10 przedstawia porównanie całkowitej ekspresji VEGF w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem. Istotnie większą ekspresję tego markera wykazano w dziąsłach chorych z CP.

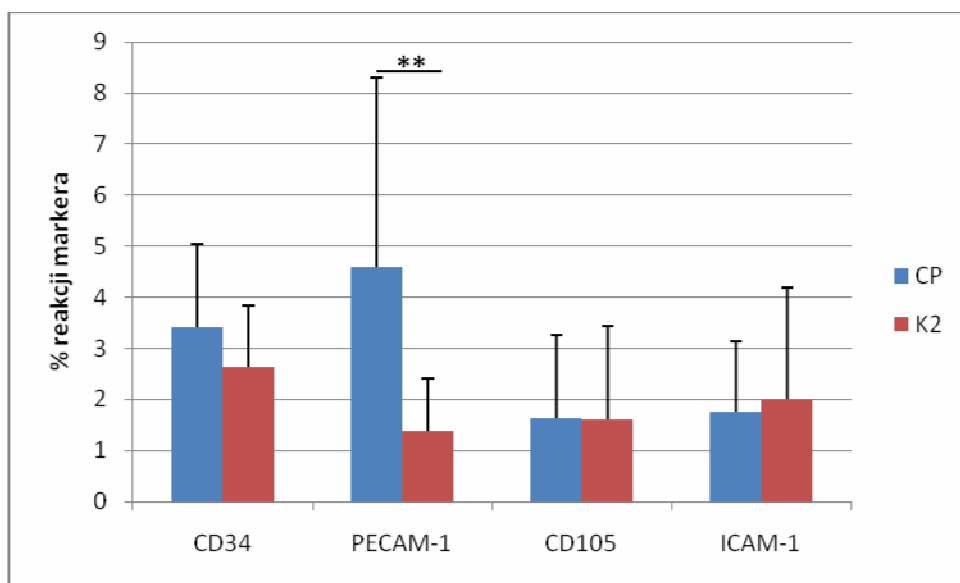


Rycina 10. Porównanie **sumarycznej** (HEV, naczynia typowe i komórki nacieku zapalnego) ekspresji VEGF pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i kontrolą 1 (K1) (test Manna-Whitneya); \*\*\*  $p < 0,001$

## 9.2. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w dziąsłach pacjentów z CP i odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2)

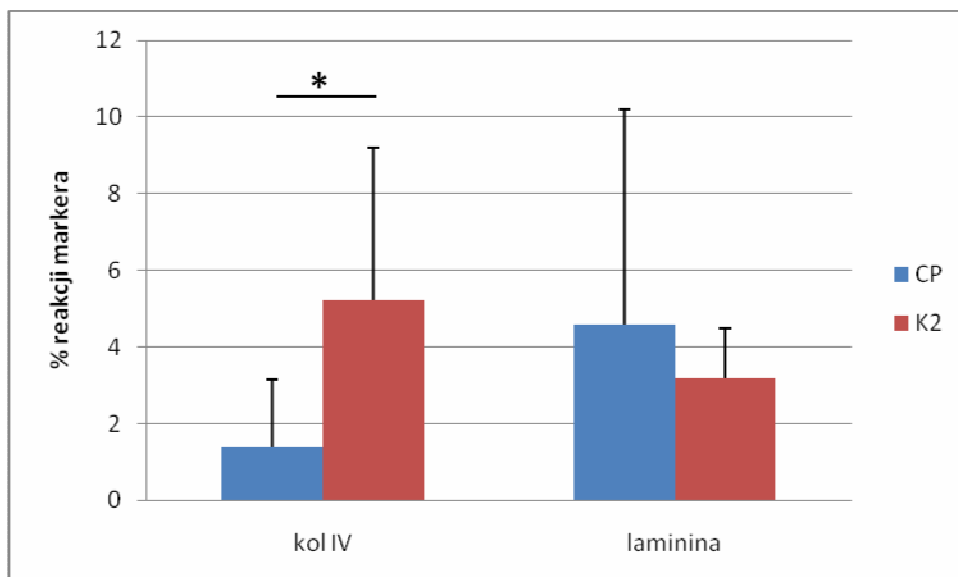
Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w przypadku dziąseł pacjentów z CP i kontroli pozytywnej (grupa K2) przedstawia Tabela 14 i Ryciny 11 i 12. Należy dodać, że porównanie to dotyczy ekspresji obu markerów w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV), bo takie naczynia dominowały w przypadku materiału tkankowego z grupy kontrolnej 2 (K2).

Statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupami dostrzeżono w przypadku ekspresji kolagenu typu IV w HEV dziąseł, która była wyższa w grupie K2 ( $5,21 \pm 5,60\%$ ) w porównaniu z CP ( $1,69 \pm 2,04\%$ ) ( $p=0,0418$ ). Druga istotna różnica dotyczyła ekspresji PECAM-1, która natomiast była wyższa w dziąsłach pacjentów z CP ( $8,34 \pm 6,58$ ) aniżeli w HEV węzłów chłonnych odczynowych (K2) ( $1,37 \pm 1,03$ ) ( $p=0,0097$ ). W przypadku pozostałych markerów różnice ekspresji były nieistotne statystycznie ( $p>0,05$ ) (Rycina 11).



Rycina 11. Porównanie ekspresji **markerów błonowych** (CD34, PECAM-1, endogliny i ICAM-1) naczyń typu HEV pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i kontrolą 2 (K2) (test Manna-Whitneya); \*\* -  $p<0,001$ .

Z badanych markerów błony podstawnej naczyń (kolagen IV, laminina), istotnie większą ekspresję kolagenu IV wykazywały błony podstawne komórek śródbłonka HEV grupy kontrolnej 2 (K2) w porównaniu z analogicznymi strukturami w HEV pacjentów z CP (Rycina 12).



Rycina 12. Porównanie ekspresji **markerów błony podstawnej naczyń krwionośnych** w naczyniach HEV pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i kontrolą 2 (K2) (test Manna-Whitneya); kol IV – kolagen typu IV; \* -  $p < 0,05$ .

**Tabela 14.** Porównanie ekspresji antygenów naczyniowych w HEV w badanych dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2) (test Manna-Whitneya).

Marker	CP	K2	p
CD34	3,42±1,61	2,64±1,21	0,2173
PECAM-1	4,58±3,72	1,37±1,03	0,0097
Endoglina	1,64±1,61	1,60±1,83	0,8590
ICAM-1	1,75±1,38	2,02±2,16	0,9485
Kolagen IV	1,38±1,76	5,21±5,60	0,0418
Laminina	4,60±4,00	3,19±1,31	0,6436
VEGF	0,87±2,70	0,01±0,01	0,7347

**Objaśnienia:** W Tabeli podano średnią procentową ekspresję markerów±SD; K2 – grupa kontrolna 2 (węzły chłonne odczynowe), CP- przewlekłe zapalenie przyzębia; p – poziom istotności; czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne

## 10. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od klinicznego poziomu/utraty przyczepu (CAL) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

W badaniach nie wykazano różnic statystycznie istotnych w ekspresji żadnego z markerów naczyniowych w dziąsłach pacjentów z CP w zależności od wartości parametru CAL i to niezależnie od badanego rodzaju naczynia krwionośnego (Tabele 15-17).

**Tabela 15.** Ekspresja markerów naczyniowych w HEV w zależności od parametru CAL (test Kruskala-Wallisa).

Marker	CAL	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	6	3,55	2,44	5,05	1,17	0,6560
	2	10	3,05	1,55	5,75	1,35	
	3	41	3,50	0,00	7,61	1,74	
PECAM-1	1	2	0,94	0,70	1,17	0,33	-*
	2	2	4,80	4,43	5,16	0,52	
	3	21	4,90	0,16	13,07	3,89	
Endoglina	1	6	1,20	0,19	3,51	1,19	0,0778
	2	10	0,87	0,00	3,26	1,11	
	3	45	1,87	0,00	6,41	1,71	
ICAM-1	1	2	0,24	0,21	0,26	0,04	-*
	2	3	3,64	1,73	6,39	2,44	
	3	21	1,63	0,00	3,66	1,00	
Kolagen IV	1	6	1,13	0,18	2,20	0,87	0,2954
	2	11	0,74	0,05	1,66	0,62	
	3	44	1,58	0,03	10,49	2,00	
Laminina	1	4	2,29	0,00	6,50	2,89	0,2117
	2	5	5,96	2,27	8,29	2,44	
	3	26	4,69	0,00	15,44	4,31	
VEGF	1	2	0,00	0,00	0,00	0,00	-*
	2	1	0,00	0,00	0,00	-	
	3	16	1,03	0,00	11,08	2,93	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); CAL 1:  $\leq 3$ mm, CAL 2: 4-6mm, CAL 3:  $\geq 7$ mm; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

**Tabela 16.** Ekspresja markerów naczyniowych w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła w zależności od parametru CAL (test Kruskala-Wallisa).

Marker	CAL	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	6	2,86	1,35	5,21	1,36	0,6567
	2	10	2,47	1,24	4,72	1,11	
	3	41	2,67	0,00	6,26	1,21	
PECAM-1	1	2	1,50	1,45	1,56	0,08	-*
	2	3	2,62	0,58	4,55	1,99	
	3	21	4,36	0,42	13,56	3,50	
Endoglina	1	6	0,69	0,20	1,73	0,61	0,6723
	2	10	0,84	0,00	2,44	0,93	
	3	45	1,26	0,00	6,10	1,45	
ICAM-1	1	2	0,24	0,17	0,32	0,11	-*
	2	3	1,27	0,61	1,95	0,67	
	3	20	1,10	0,00	3,63	0,96	
Kolagen IV	1	6	0,33	0,00	1,42	0,55	0,6330
	2	11	0,39	0,00	0,87	0,30	
	3	44	0,70	0,00	5,87	1,15	
Laminina	1	4	1,96	0,52	3,41	1,20	0,3560
	2	5	2,78	1,55	3,91	0,94	
	3	26	4,20	0,25	24,29	4,52	
VEGF	1	4	1,21	0,00	2,45	1,18	0,5758
	2	6	2,44	0,57	6,95	2,65	
	3	32	3,57	0,00	23,81	5,01	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); CAL 1:  $\leq 3$ mm, CAL 2: 4-6mm, CAL 3:  $\geq 7$ mm; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

**Tabela 17.** Całkowita ekspresja markerów naczyniowych (w HEV i naczyniach typowych) w zależności od parametru CAL (test Kruskala-Wallisa).

Marker	CAL	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	6	6,41	3,80	10,26	2,39	0,6504
	2	10	5,51	2,89	10,47	2,36	
	3	41	6,16	1,04	13,47	2,72	
PECAM-1	1	2	2,44	2,26	2,62	0,25	-*
	2	3	5,81	0,58	8,98	4,57	
	3	21	9,26	1,01	26,63	6,84	
Endogлина	1	6	1,89	0,39	4,67	1,62	0,2039
	2	10	1,72	0,00	4,97	1,89	
	3	45	3,14	0,00	9,45	2,79	
ICAM-1	1	2	0,48	0,43	0,53	0,07	-*
	2	3	4,91	3,00	7,00	2,00	
	3	21	2,67	0,00	6,74	1,76	
Kolagen IV	1	6	1,24	0,15	2,71	1,07	0,6064
	2	11	0,96	0,05	2,02	0,65	
	3	44	1,94	0,04	11,17	2,31	
Laminina	1	4	4,26	1,72	9,92	3,82	0,2926
	2	5	8,74	5,72	12,20	2,50	
	3	26	8,89	0,25	24,29	6,36	
VEGF	1	4	1,21	0,00	2,45	1,18	0,5750
	2	6	2,44	0,57	6,95	2,65	
	3	32	4,08	0,00	23,81	5,55	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziaśła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); CAL 1:  $\leq 3$ mm, CAL 2: 4-6mm, CAL 3:  $\geq 7$ mm; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

## 11. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od aktywności zapalnej w dziaśłach (*grading*) u pacjentów z CP

W badaniach obecnych wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji markerów naczyniowych w zależności od aktywności zmian zapalnych w dziaśłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (Tabele 18-20). I tak, istotnie większa ekspresja cząsteczki CD34 obserwowana była w HEV dziaśła u pacjentów z większym nasileniem zmian zapalnych dziaśła (*grading*, G). W G3 wynosiła ona średnio  $3,79 \pm 1,67\%$  reakcji, a w przypadku z G2 -  $2,86 \pm 1,38\%$  ( $p=0,0364$ ) (Tabela 18). Różnice dotyczyły także całkowitej ekspresji naczyniowej PECAM-1 w zależności od aktywności zapalnej. W przypadku G3, ekspresja PECAM-1 była wyższa ( $9,80 \pm 6,48\%$ ) niż w przypadku analogicznej ekspresji w G2 ( $5,04 \pm 5,90\%$ ) ( $p=0,0259$ ) (Tabela 20).

W Tabelach nie ujęto porównawczej ekspresji markerów u pacjentów demonstrujących G1 w analizowanych dziąsłach ze względu na zbyt małą liczebność grupy i brak możliwości wykonania obliczeń statystycznych.

**Tabela 18.** Ekspresja markerów naczyniowych w HEV w zależności od aktywności zmian zapalnych (*grading*) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) (test Manna-Whitneya).

Marker	Grading	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	3	2,31	1,55	2,82	0,67	-*
	2	18	2,86	1,17	5,85	1,38	0,0364
	3	36	3,79	0,00	7,61	1,67	
PECAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	4	0,12	0,00	0,49	0,25	-*
	3	18	5,30	0,16	13,07	3,85	0,0639
Endogлина	1	4	0,82	0,00	1,34	0,61	-*
	2	18	1,36	0,00	5,73	1,47	0,2285
	3	39	1,86	0,00	6,41	1,72	
ICAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	7	1,12	0,00	2,79	1,12	0,1353
	3	19	1,98	0,43	6,39	1,41	
Kolagen IV	1	3	1,21	0,05	1,82	1,01	-*
	2	20	1,07	0,12	2,78	0,85	0,8394
	3	38	1,56	0,03	10,49	2,12	
Laminina	1	2	4,15	0,00	8,29	5,86	-*
	2	11	3,99	0,00	10,22	3,78	0,5098
	3	22	4,95	0,00	15,44	4,15	
VEGF	1	1	0,00	0,00	0,00	-	-*
	2	4	0,12	0,00	0,49	0,25	0,9588
	3	14	1,14	0,00	11,08	3,13	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); *Grading* oceniono w 4-pkt skali półilościowej (Materiał i Metody); czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

**Tabela 19.** Ekspresja markerów naczyniowych w naczyniach typowych w zależności od aktywności zmian zapalnych (*grading*) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) (test Manna-Whitneya).

Marker	Grading	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	3	2,40	2,12	2,97	0,49	-*
	2	18	2,47	1,24	5,21	1,09	0,2944
	3	36	2,76	0,00	6,26	1,29	
PECAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	8	2,66	0,42	9,79	3,18	0,0540
	3	18	4,51	0,85	13,56	3,29	
Endogлина	1	4	0,32	0,00	0,59	0,24	-*
	2	18	1,11	0,00	6,10	1,47	0,6893
	3	39	1,24	0,00	5,00	1,31	
ICAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	6	0,71	0,00	1,95	0,72	0,3025
	3	19	1,16	0,08	3,63	0,96	
Kolagen IV	1	3	0,48	0,00	1,42	0,82	-*
	2	20	0,44	0,00	2,61	0,66	0,3173
	3	38	0,71	0,00	5,87	1,16	
Laminina	1	2	2,81	1,72	3,91	1,55	-*
	2	11	2,51	0,25	6,43	1,80	0,1140
	3	22	4,44	0,49	24,29	4,77	
VEGF	1	4	3,07	0,00	6,95	3,17	-*
	2	12	2,42	0,13	10,30	2,84	0,8648
	3	26	3,55	0,00	23,81	5,34	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); *Grading* oceniono w 4-pkt skali półilościowej (Materiał i Metody); \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego



**Tabela 20.** Porównanie całkowitej ekspresji markerów naczyniowych (w HEV i w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła) w zależności od aktywności zmian zapalnych (*grading*) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) (test Manna-Whitneya).

Marker	<i>Grading</i>	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	3	4,71	3,66	5,79	1,06	-*
	2	18	5,33	2,89	10,26	2,30	0,0621
	3	36	6,56	1,04	13,47	2,74	
PECAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	8	5,04	0,58	18,10	5,90	0,0259
	3	18	9,80	1,01	26,63	6,48	
Endoglina	1	4	1,14	0,00	1,80	0,83	-*
	2	18	2,46	0,00	8,56	2,33	0,5919
	3	39	3,10	0,00	9,45	2,80	
ICAM-1	1	0	-	-	-	-	-*
	2	7	1,73	0,00	4,74	1,79	0,0829
	3	19	3,14	0,88	7,00	1,91	
Kolagen IV	1	3	1,43	0,05	2,71	1,33	-*
	2	20	1,28	0,15	3,03	1,00	0,7518
	3	38	1,93	0,04	11,17	2,44	
Laminina	1	2	6,96	1,72	12,20	7,41	-*
	2	11	6,49	0,25	15,93	5,31	0,1908
	3	22	9,39	1,33	24,29	5,99	
VEGF	1	4	3,07	0,00	6,95	3,17	-*
	2	12	2,46	0,13	10,30	2,86	0,7687
	3	26	4,16	0,00	23,81	5,96	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); *Grading* oceniono w 4-pkt skali półilościowej (Materiał i Metody); czerwoną czcionką zaznaczono różnice statystycznie istotne; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

## 12. Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w zależności od postaci choroby (uogólniona vs. zlokalizowana) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia

Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w ekspresji żadnego z badanych markerów naczyniowych i w żadnym rodzaju naczyń krwionośnych w dziąsłach pacjentów ze zlokalizowaną i/lub uogólnioną postacią choroby (Tabele 21-23).

**Tabela 21.** Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w HEV u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia w zależności od postaci choroby (test Manna-Whitneya).

Marker	Postać choroby	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	24	3,40	1,17	7,21	1,57	0,5367
	2	33	3,44	0,00	7,61	1,67	
PECAM-1	1	14	3,52	0,70	8,30	2,07	0,4030
	2	11	5,92	0,16	13,07	4,91	
Endoglina	1	26	1,64	0,12	6,41	1,64	0,9942
	2	35	1,64	0,00	5,85	1,62	
ICAM-1	1	14	1,42	0,21	2,91	0,88	0,3217
	2	12	2,14	0,00	6,39	1,76	
Kolagen IV	1	27	1,35	0,08	10,49	2,06	0,4401
	2	34	1,41	0,03	7,52	1,51	
Laminina	1	15	5,57	0,00	15,44	4,26	0,2143
	2	20	3,87	0,00	13,14	3,74	
VEGF	1	10	0,49	0,00	4,79	1,51	0,9048
	2	22	3,83	0,00	23,81	5,52	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dźwięka z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); 1 – postać zlokalizowana CP; 2 – postać uogólniona CP

**Tabela 22.** Porównanie ekspresji markerów naczyniowych w naczyniach typowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia w zależności od postaci choroby (test Manna-Whitneya).

Marker	Postać choroby	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	24	2,59	1,35	6,26	1,18	0,3902
	2	33	2,70	0,00	5,43	1,22	
PECAM-1	1	15	3,41	0,58	9,79	2,78	0,4742
	2	11	4,66	0,42	13,56	3,94	
Endoglina	1	26	1,39	0,00	6,10	1,59	0,2995
	2	35	0,95	0,00	4,46	1,07	
ICAM-1	1	13	1,15	0,15	3,63	1,01	0,5382
	2	12	0,94	0,00	3,10	0,83	
Kolagen IV	1	27	0,49	0,00	2,65	0,72	0,4231
	2	34	0,71	0,00	5,87	1,19	
Laminina	1	15	3,10	1,33	6,43	1,71	0,7798
	2	20	4,22	0,25	24,29	5,08	
VEGF	1	20	2,46	0,00	13,57	3,10	0,7936
	2	22	3,83	0,00	23,81	5,52	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dźwięka z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); 1 – postać zlokalizowana CP; 2 – postać uogólniona CP

**Tabela 23.** Porównanie sumarycznej ekspresji markerów naczyniowych (w HEV i typowych naczyniach krwionośnych dziąsła) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia w zależności od postaci choroby (test Manna-Whitneya).

Marker	Postać choroby	n	Średnia	Minimum	Maksimum	SD	p
CD34	1	24	5,98	2,83	13,47	2,54	0,6708
	2	33	6,14	1,04	12,95	2,68	
PECAM-1	1	15	6,69	0,58	18,10	4,65	0,2586
	2	11	10,58	1,01	26,63	8,27	
ICAM-1	1	14	2,49	0,43	6,55	1,82	0,4319
	2	12	3,08	0,00	7,00	2,12	
Endoglina	1	26	3,03	0,12	9,45	2,78	0,5971
	2	35	2,59	0,00	9,28	2,50	
Kolagen IV	1	27	1,56	0,09	11,17	2,21	0,4662
	2	34	1,80	0,04	9,22	1,92	
Laminina	1	15	8,67	1,33	20,06	5,24	0,5206
	2	20	8,09	0,25	24,29	6,36	
VEGF	1	20	2,71	0,00	13,57	3,33	0,8518
	2	22	4,36	0,00	23,81	6,14	

**Objaśnienia:** W Tabeli podano: liczbę badanych preparatów dziąsła z dodatnią reakcją (n), wartości średniej, minimalnej oraz maksymalnej wartości ekspresji markera wyrażone w % pola pozytywnej reakcji immunocytochemicznej, odchylenia standardowe (SD) i poziom istotności (p); 1 – postać zlokalizowana CP; 2 – postać uogólniona CP

### **13. Korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją markerów naczyń w badanych grupach pacjentów**

Sumaryczne zestawienie uzyskanych korelacji pomiędzy wzajemną ekspresją wszystkich badanych w tej pracy markerów naczyń krwionośnych (HEV i typowych naczyń krwionośnych dziąsła) przedstawiono w Tabeli 26. Dla przejrzystości przedstawione zostaną najpierw korelacje dotyczące ekspresji markerów w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) (Tabela 24), następnie w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła w poszczególnych grupach badanych (Tabela 25).

#### **13.1. Korelacje wzajemnej ekspresji markerów w naczyniach HEV u pacjentów z CP**

Wykazano wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ekspresją CD34 w HEV a ekspresją dwóch innych markerów błonowych, tj. endogliny (CD105) oraz ICAM-1, a także z ekspresją markera błon podstawnych - kolagenu IV (odpowiednio:  $r=0,6175$ ;  $r=0,6704$ ;  $r=0,4188$ ;  $p<0,05$ ) (Rycina 13; Tabela 24).

Ekspresja endogliny w HEV korelowała (prócz CD34 wskazanej wyżej) także z ekspresją ICAM-1 i kolagenu IV (odpowiednio:  $r=0,6115$ ;  $r=0,5856$ ;  $p<0,05$ ).

Wykazano także wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ekspresją PECAM-1 i ICAM-1 ( $r=0,4315$ ,  $p<0,05$ ) (Rycina 14). Ekspresja PECAM-1 rosła także wraz z ekspresją kolagenu IV w naczyniach typu HEV u pacjentów z CP ( $r=0,5539$ ;  $p<0,05$ ).

Ekspresja kolagenu IV korelowała pozytywnie z ekspresją wszystkich badanych markerów błonowych komórek śródbłonka HEV, tj. CD34 (wykazaną wcześniej – Rycina 13), endogliny (CD105), ICAM-1 i PECAM-1 (odpowiednio:  $r=0,4123$ ,  $r=0,5539$ ,  $p<0,05$ ) (Rycina 15).

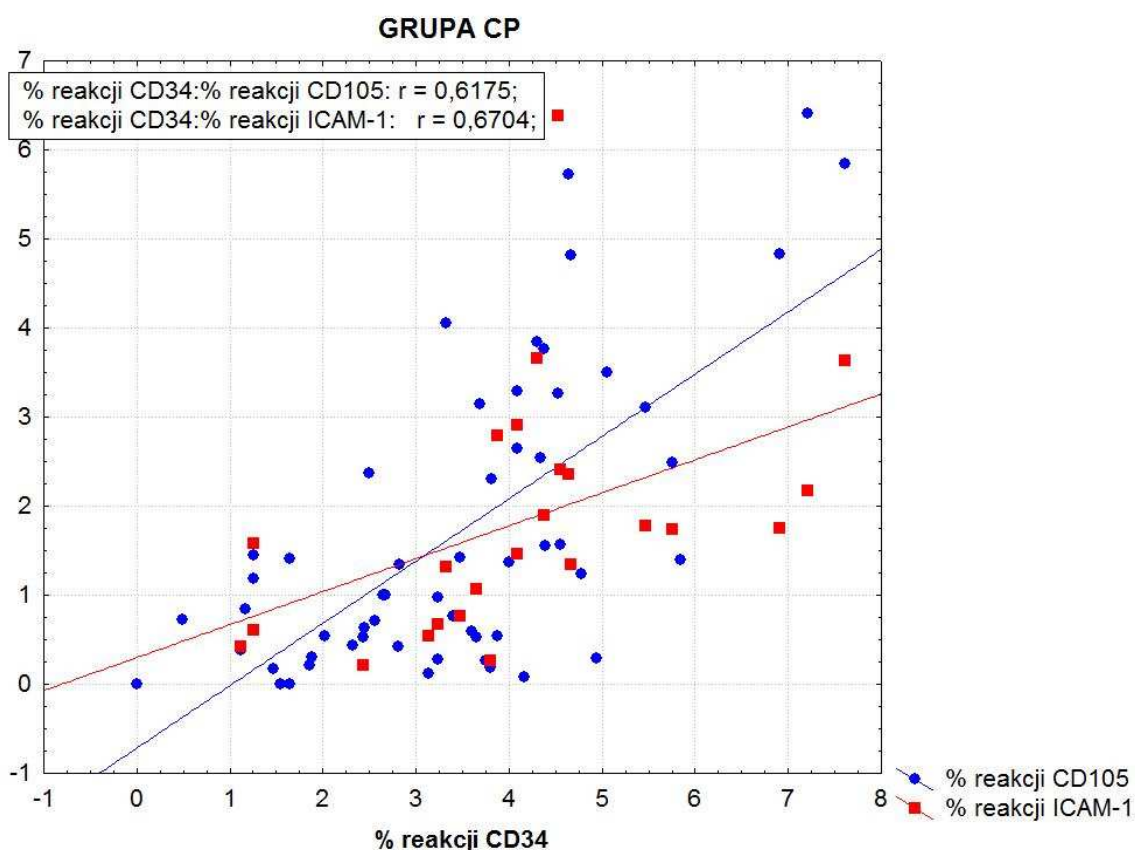
Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją tkankową lamininy z pozostałymi markerami w HEV.

Podobnie ekspresja VEGF nie korelowała istotnie z innymi antygenami naczyń HEV u pacjentów z CP (Tabela 24).

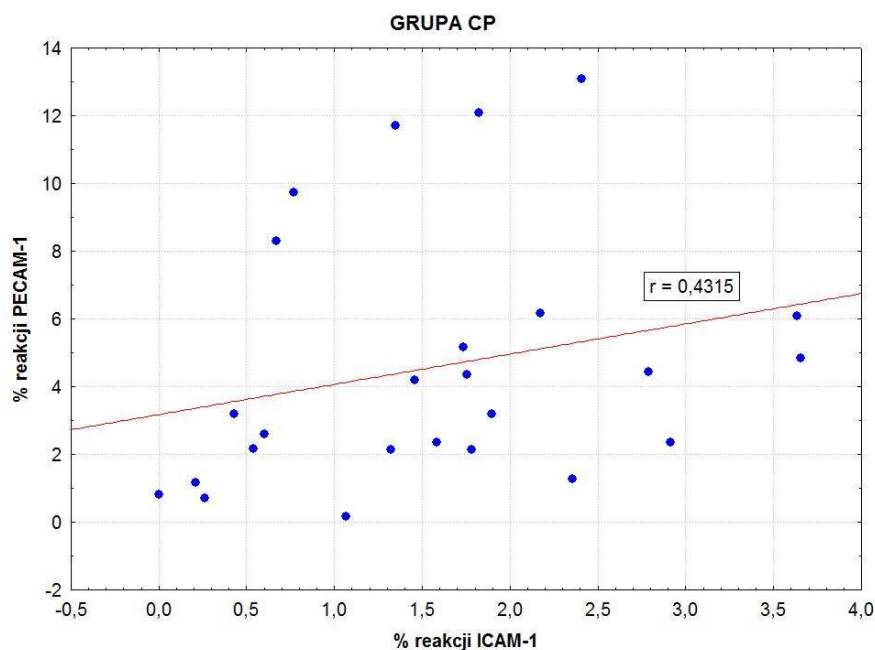
**Tabela 24.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyńiowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w śródbłonku HEV u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Marker	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	0,3794	0,6175	0,6704	0,4188	0,1733	0,0123
PECAM-1	0,3794	-	0,2330	0,4315	0,5539	0,1957	-0,3567
Endoglina	0,6175	0,2330	-	0,6115	0,5856	0,1905	-0,1279
ICAM-1	0,6704	0,4315	0,6115	-	0,4123	0,3407	-0,4434
Kolagen IV	0,4188	0,5539	0,5856	0,4123	-	-0,0092	-0,2927
Laminina	0,1733	0,1957	0,1905	0,3407	-0,0092	-	0,1563
VEGF	0,0123	-0,3567	-0,1279	-0,4434	-0,2927	0,1563	-

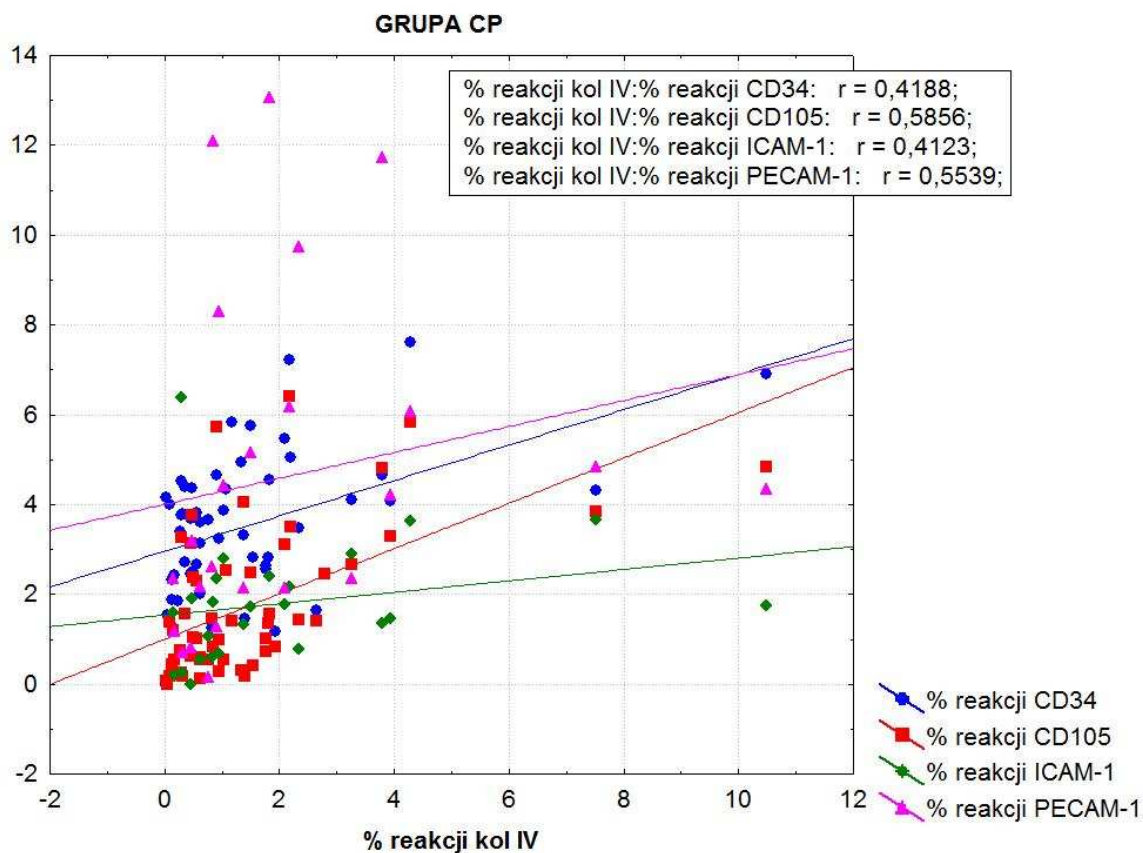
**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których  $p < 0,05$



Rycina 13. Pozytywna korelacja Spearmana pomiędzy ekspresją CD34 oraz CD105 (endoglina) i ICAM-1 w śródbłonku HEV dziąseł pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ( $p < 0,05$ ); r – współczynnik korelacji rang Spearmana.



Rycina 14. Pozytywna korelacja Spearmana między ekspresją ICAM-1 i PECAM-1 w śródbłonku HEV dziąseł pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ( $p < 0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji rang Spearmana.



Rycina 15. Pozytywna korelacja Spearmana pomiędzy ekspresją kolagenu IV oraz wszystkich markerów błonowych: CD34, PECAM-1, endogliny (CD105) i ICAM-1 w śródbłonku HEV dziąseł pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia ( $p < 0,05$ );  $r$  – współczynnik korelacji rang Spearmana.

### 13.2. Korelacje wzajemnej ekspresji markerów w typowych naczyniach krwionośnych dZIAŁA u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia

W dZIAŁACH pacjentów z CP obserwowano liczne korelacje pomiędzy wzajemną ekspresją markerów w obrębie naczyń zwykłych (Tabela 25), z których najważniejsze obejmują:

1. pozytywną zależność pomiędzy ekspresją CD34 i endogliny (CD105);
2. pozytywną korelację pomiędzy ekspresją kolagenu IV i ekspresją wszystkich markerów błonowych: CD34 i PECAM-1, endogliny i ICAM-1.
3. ekspresja VEGF (naczynia typowe oraz ekspresja w nacieku zapalnym *lamina propria*) oprócz negatywnej korelacji z ekspresją endogliny, korelowała pozytywnie z ekspresją lamininy.

**Tabela 25.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w śródbłonce typowych naczyń krwionośnych dZIAŁA u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Marker	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	0,1191	0,4450	0,2796	0,3698	-0,2069	-0,0882
PECAM-1	0,1191	-	0,0346	0,2278	0,5204	0,1083	-0,3377
Endoglina	0,4450	0,0346	-	0,5440	0,5596	-0,1049	-0,3367
ICAM-1	0,2796	0,2278	0,5440	-	0,4932	0,3825	0,0466
Kolagen IV	0,3698	0,5204	0,5596	0,4932	-	-0,0532	-0,2271
Laminina	-0,2069	0,1083	-0,1049	0,3825	-0,0532	-	0,4821
VEGF	-0,0882	-0,3377	-0,3367	0,0466	-0,2271	0,4821	-

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których  $p < 0,05$

**Tabela 26.** Zbiorcze wyniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją markerów naczyńniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w śródbłonku HEV i typowych naczyń krwionośnych dziaśła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Marker i typ naczynia	CD 34 HEV	CD34 typowe	PECAM-1 HEV	PECAM-1 typowe	Endoglina HEV	Endoglina typowe	ICAM-1 HEV	ICAM-1 typowe	Kolagen IV HEV	Kolagen IV typowe	Laminina HEV	Laminina typowe	VEGF HEV	VEGF typowe
CD 34 HEV	-	0,6503	0,3794	0,2670	0,6175	0,5370	0,6704	0,4160	0,4188	0,5622	0,1733	-0,2470	0,0123	-0,3634
CD34 typowe	0,6503	-	0,1304	0,1191	0,4557	0,4450	0,5096	0,2796	0,3869	0,3698	0,0139	-0,2069	0,1722	-0,0882
PECAM-1 HEV	0,3794	0,1304	-	0,7854	0,2330	0,0230	0,4315	0,2661	0,5539	0,5014	0,1957	0,1140	-0,3567	-0,2301
PECAM-1 typowe	0,2670	0,1191	0,7854	-	0,1569	0,0346	0,3269	0,2278	0,4162	0,5204	0,0587	0,1083	-0,2601	-0,3377
Endoglina HEV	0,6175	0,4557	0,2330	0,1569	-	0,7123	0,6115	0,3765	0,5856	0,5317	0,1905	-0,1366	-0,1279	-0,3594
Endoglina typowe	0,5370	0,4450	0,0230	0,0346	0,7123	-	0,4966	0,5440	0,5181	0,5596	0,2768	-0,1049	-0,0172	-0,3367
ICAM-1 HEV	0,6704	0,5096	0,4315	0,3269	0,6115	0,4966	-	0,5054	0,4123	0,5028	0,3407	0,0015	-0,4434	-0,2455
ICAM-1 typowe	0,4160	0,2796	0,2661	0,2278	0,3765	0,5440	0,5054	-	0,2661	0,4932	0,5599	0,3825	-0,1672	0,0466
Kolagen IV HEV	0,4188	0,3869	0,5539	0,4162	0,5856	0,5181	0,4123	0,2661	-	0,5473	-0,0092	-0,1654	-0,2927	-0,1467
Kolagen IV typowe	0,5622	0,3698	0,5014	0,5204	0,5317	0,5596	0,5028	0,4932	0,5473	-	0,1072	-0,0532	-0,1992	-0,2271
Laminina HEV	0,1733	0,0139	0,1957	0,0587	0,1905	0,2768	0,3407	0,5599	-0,0092	0,1072	-	0,4334	0,1563	0,3117
Laminina typowe	-0,2470	-0,2069	0,1140	0,1083	-0,1366	-0,1049	0,0015	0,3825	-0,1654	-0,0532	0,4334	-	0,4496	0,4821
VEGF HEV	0,0123	0,1722	-0,3567	-0,2601	-0,1279	-0,0172	-0,4434	-0,1672	-0,2927	-0,1992	0,1563	0,4496	-	0,4208
VEGF typowe	-0,3634	-0,0882	-0,2301	-0,3377	-0,3594	-0,3367	-0,2455	0,0466	-0,1467	-0,2271	0,3117	0,4821	0,4208	-

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których  $p < 0,05$



### 13.3. Korelacje dotyczące wzajemnej ekspresji markerów naczyń u pacjentów z grupy kontrolnej („zdrowe” przyzębie, grupa K1)

W grupie K1 nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją markerów naczyń w naczyniach HEV ze względu na obecność zbyt małej liczby naczyń typu HEV w „zdrowych” dziąsłach. Natomiast korelowanie wzajemnej ekspresji markerów w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła wykazało jedyną istotną statystycznie i to wysoką pozytywną zależność pomiędzy ekspresją endogliny (CD105) i PECAM-1 (CD31) ( $r=0,8117$ ,  $p<0,05$ ) (Tabela 27).

**Tabela 27.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyń ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w śródbłonku typowych naczyń krwionośnych dziąsła u pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa K1).

Marker	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	0,1429	0,0070	0,4857	-0,0714	0,6786	-0,4009
PECAM-1	0,1429	-	0,8117	0,5429	0,7000	0,3714	-0,1309
Endoglina	0,0070	0,8117	-	0,1160	0,0541	-0,3336	-0,6472
ICAM-1	0,4857	0,5429	0,1160	-	0,3000	0,4857	0,3928
Kolagen IV	-0,0714	0,7000	0,0541	0,3000	-	0,2571	-0,7071
Laminina	0,6786	0,3714	-0,3336	0,4857	0,2571	-	0,3928
VEGF	-0,4009	-0,1309	-0,6472	0,3928	-0,7071	0,3928	-

**Objaśnienia:** czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których  $p<0,05$

### 13.4. Korelacje dotyczące wzajemnej ekspresji markerów HEV u pacjentów z grupy kontrolnej (odczynowe węzły chłonne, grupa K2)

W grupie kontrolnej 2 nie stwierdzono żadnych wzajemnych korelacji pomiędzy ekspresją markerów naczyń (wszystkie wyniki korelacji rang Spearmana nieistotne statystycznie) (Tabela 28).

**Tabela 28.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w śródbłonku HEV w odczynowych węzłach chłonnych (grupa kontrolna K2).

Marker	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	-0,6124	0,3929	0,1071	0,3214	0,5357	-0,4643
PECAM-1	-0,6124	-	-0,6124	-0,4082	0,4082	-0,6124	0,6124
Endoglina	0,3929	-0,6124	-	-0,3214	-0,1071	-0,2143	-0,3214
ICAM-1	0,1071	-0,4082	-0,3214	-	-0,2857	0,7143	-0,2500
Kolagen IV	0,3214	0,4082	-0,1071	-0,2857	-	-0,2143	-0,1786
Laminina	0,5357	-0,6124	-0,2143	0,7143	-0,2143	-	-0,5000
VEGF	-0,4643	0,6124	-0,3214	-0,2500	-0,1786	-0,5000	-

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości współczynnika korelacji Spearmana  $r$ ,  $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach

### 13.5. Korelacje pomiędzy wzajemną całkowitą ekspresją markerów naczyniowych (HEV i typowe naczynia krwionośne dziąsła)

#### 13.5.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

Wprost proporcjonalna zależność dotyczyła sumarycznej ekspresji CD34 z ekspresją endogliny, ICAM-1 i kolagenu IV (odpowiednio:  $r=0,5583$ ;  $r=0,6167$ ;  $r=0,4831$ ;  $p < 0,05$ ) (Tabela 29), przy czym korelacja z ekspresją endogliny była wysoka. Wysoką pozytywną korelację obserwowano także pomiędzy ekspresją endogliny i ICAM-1 ( $r=0,6585$ ) oraz endogliny i kolagenu IV ( $r=0,6690$ ). Ekspresja kolagenu IV (prócz CD34, endogliny) korelowała również z sumaryczną ekspresją PECAM-1 ( $r=0,5915$ ). Wykazano także wprost proporcjonalne korelacje pomiędzy ekspresją VEGF i lamininy ( $r=0,5340$ ) (Tabela 29).

**Tabela 29.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między sumaryczną ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Całkowita ekspresja*	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	0,2313	0,6167	0,5583	0,4831	-0,1056	-0,2479
PECAM-1	0,2313	-	0,1477	0,3254	0,5915	0,0812	-0,3701
Endoglina	0,6167	0,1477	-	0,6585	0,6690	0,0497	-0,2728
ICAM-1	0,5583	0,3254	0,6585	-	0,3754	0,1639	-0,1649
Kolagen IV	0,4831	0,5915	0,6690	0,3754	-	-0,0304	-0,1997
Laminina	-0,1056	0,0812	0,0497	0,1639	-0,0304	-	0,5340
VEGF	-0,2479	-0,3701	-0,2728	-0,1649	-0,1997	0,5340	-

**Objaśnienia:** \* - oznacza ekspresję markera w śródbłonku HEV i naczyń krwionośnych typowych; czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których  $p < 0,05$

### 13.5.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzębiem (kontrola K1).

Nie wykazano wzajemnych korelacji pomiędzy całkowitą (sumaryczną) ekspresją markerów naczyniowych u pacjentów ze „zdrowym” przyzębiem (grupa kontrolna K1) (Tabela 30).

**Tabela 30.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między całkowitą ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) u pacjentów ze „zdrowym” przyzębiem (grupa kontrolna K1)

Całkowita ekspresja*	CD34	PECAM-1	Endoglina	ICAM-1	Kolagen IV	Laminina	VEGF
CD34	-	-0,0857	0,0493	-0,0286	-0,0714	0,4643	-0,0445
PECAM-1	-0,0857	-	0,6377	0,7714	0,2000	0,3714	-0,1309
Endoglina	0,0493	0,6377	-	0,3479	0,0541	-0,2965	-0,6472
ICAM-1	-0,0286	0,7714	0,3479	-	0,2000	0,0286	0,1309
Kolagen IV	-0,0714	0,2000	0,0541	0,2000	-	0,0286	-0,7071
Laminina	0,4643	0,3714	-0,2965	0,0286	0,0286	-	0,3928
VEGF	-0,0445	-0,1309	-0,6472	0,1309	-0,7071	0,3928	-

**Objaśnienia:** W Tabeli podano wartości współczynnika korelacji Spearmana r,  $p > 0,05$  we wszystkich przypadkach; \* - oznacza ekspresję markera w śródbłonku HEV i typowych naczyń krwionośnych

## 14. Korelacje pomiędzy ekspresją markerów naczyniowych a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów

### 14.1. Ekspresja markerów a wiek pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)

Wyniki korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją markerów w naczyniach krwionośnych i wiekiem pacjentów z CP przedstawiono w Tabeli 31. Jak z niej wynika, jedyną i to negatywną korelację obserwowano pomiędzy ekspresją lamininy w obrębie HEV i wiekiem pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Innymi słowy, wraz z wiekiem chorych, malała ekspresja tego markera w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem. Nie wykazano żadnych innych zależności ekspresji markerów naczyniowych od wieku pacjentów (Tabela 31).

**Tabela 31.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) we śródbłonku naczyń krwionośnych dziąsła a wiekiem pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Korelacje cech statystycznych	Typ naczyń	n	r	p
Ekspresja CD34 a WIEK	HEV	57	-0,1017	0,4514
	typowe	57	0,0475	0,7256
	∑ HEV i typowe	57	-0,0806	0,5513
Ekspresja PECAM-1 a WIEK	HEV	25	0,1323	0,5286
	typowe	26	0,2797	0,1663
	∑ HEV i typowe	26	0,2581	0,2029
Ekspresja endogliny a WIEK	HEV	61	-0,0644	0,6218
	typowe	61	-0,1809	0,1630
	∑ HEV i typowe	61	-0,0795	0,5426
Ekspresja ICAM-1 a WIEK	HEV	26	0,0587	0,7759
	typowe	25	0,1467	0,4842
	∑ HEV i typowe	26	0,1118	0,5866
Ekspresja kolagenu IV a WIEK	HEV	61	0,2433	0,0588
	typowe	61	0,0176	0,8926
	∑ HEV i typowe	61	0,2148	0,0965
Ekspresja lamininy a WIEK	HEV	35	<b>-0,3730</b>	<b>0,0273</b>
	typowe	35	-0,0142	0,9355
	∑ HEV i typowe	35	-0,3209	0,0602
Ekspresja VEGF a WIEK	HEV	19	-0,2270	0,3500
	typowe+naciek	42	0,0297	0,8517
	∑ HEV i typowe+naciek	42	0,0055	0,9723

**Objaśnienia:** n - liczba badanych preparatów; r - współczynnik korelacji Spearmana; p - poziom istotności; ∑ - suma; czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których p<0,05

## 14.2. Ekspresja markerów a wiek pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (K1)

Wyniki korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją markerów w naczyniach krwionośnych i wiekiem pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa kontrolna K1) przedstawia Tabela 32. Nie odnotowano żadnych zależności pomiędzy ekspresją markerów naczyń i wiekiem tej grupy pacjentów.

**Tabela 32.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyń ocenianych morfometrycznie (% reakcji) we wszystkich typach naczyń krwionośnych a wiekiem pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa K1).

Korelacje cech statystycznych	Typ naczyń	n	r	p
Ekspresja CD34 a WIEK	HEV	3	0,8660	-*
	typowe	14	0,0794	0,7873
	∑ HEV i typowe	14	0,1654	0,5721
Ekspresja PECAM-1 a WIEK	HEV	2	-	-*
	typowe	6	0,0290	0,9565
	∑ HEV i typowe	6	-0,2899	0,5774
Ekspresja endogliny a WIEK	HEV	4	0,2582	-*
	typowe	15	-0,2777	0,3163
	∑ HEV i typowe	15	-0,2369	0,3952
Ekspresja ICAM-1 a WIEK	HEV	2	-	-*
	typowe	6	-0,3769	0,4615
	∑ HEV i typowe	6	-0,6377	0,1731
Ekspresja kolagenu IV a WIEK	HEV	1	-	-*
	typowe	7	0,7208	0,0676
	∑ HEV i typowe	7	0,7208	0,0676
Ekspresja lamininy a WIEK	HEV	2	-	-*
	typowe	7	0,3784	0,4026
	∑ HEV i typowe	7	0,2703	0,5577
Ekspresja VEGF a WIEK	HEV	2	-	-*
	typowe+naciek	7	0,1348	0,7732
	∑ HEV i typowe+naciek	7	0,1348	0,7732

**Objaśnienia:** n - liczba badanych preparatów; r - współczynnik korelacji Spearmana; p - poziom istotności; ∑ - suma; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

## 14.3. Ekspresja markerów a wiek pacjentów w grupie K2 (reaktywne węzły chłonne)

Wyniki korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją markerów w naczyniach krwionośnych i wiekiem pacjentów z odczynowymi zmianami w węzłach chłonnych przedstawia Tabela 33. Podobnie jak w grupie kontrolnej 1, również w tej grupie nie wykazano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją markerów naczyń i wiekiem pacjentów (Tabela 33).

**Tabela 33.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyniowych ocenianych morfometrycznie (% reakcji) w HEV a wiekiem pacjentów z odczynowymi zmianami w węzłach chłonnych (grupa K2).

<b>Korelacje cech statystycznych</b>	<b>n</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Ekspresja CD34 a WIEK	7	0,6923	0,0847
Ekspresja PECAM-1 a WIEK	7	-0,3208	0,4829
Ekspresja endogliny a WIEK	7	0,4678	0,2898
Ekspresja ICAM-1 a WIEK	7	-0,4865	0,2682
Ekspresja kolagenu IV a WIEK	7	0,0748	0,8733
Ekspresja lamininy a WIEK	7	0,0936	0,8419
Ekspresja VEGF a WIEK	7	0,0187	0,9682

**Objaśnienia:** n - liczba badanych preparatów; r - współczynnik korelacji Spearmana; p - poziom istotności

## **15. Korelacje pomiędzy ekspresją markerów naczyniowych a aktywnością zmian zapalnych w dziąsłach (*grading*)**

### **15.1. Pacjenci z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)**

Wyniki korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją markerów w naczyniach krwionośnych i nasileniem zmian zapalnych dziąsła pacjentów z CP przedstawia Tabela 34. Wykazano, że wraz ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*) w dziąsłach pacjentów z CP, rosła ekspresja cząsteczki CD34 w żyłkach pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) oraz sumaryczna ekspresja tego markera w naczyniach krwionośnych dziąsła. Ponadto słabą wprost proporcjonalną zależność obserwowano pomiędzy *grading* a ekspresją PECAM-1 (CD31) w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła. Ekspresja pozostałych badanych markerów naczyniowych nie była skorelowana z nasileniem zmian zapalnych w dziąsłach pacjentów z CP (Tabela 34).

**Tabela 34.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana między ekspresją markerów naczyniowych obliczanych morfometrycznie (% reakcji) a *grading* w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP).

Korelacje cech statystycznych	Typ naczyń	n	r	p
Ekspresja CD34 a <i>grading</i>	HEV	57	0,3365	0,0105
	typowe	57	0,1376	0,3074
	∑ HEV i typowe	57	0,2949	0,0259
Ekspresja PECAM-1 a <i>grading</i>	HEV	25	0,3830	0,0588
	typowe	26	0,3889	0,0496
	∑ HEV i typowe	26	0,4444	0,0229
Ekspresja endogliny a <i>grading</i>	HEV	61	0,1927	0,1367
	typowe	61	0,1353	0,2984
	∑ HEV i typowe	61	0,1435	0,2700
Ekspresja ICAM-1 a <i>grading</i>	HEV	26	0,3064	0,1279
	typowe	25	0,2208	0,2889
	∑ HEV i typowe	26	0,3526	0,0773
Ekspresja kolagenu IV a <i>grading</i>	HEV	61	0,0195	0,8814
	typowe	61	0,1534	0,2378
	∑ HEV i typowe	61	0,0368	0,7784
Ekspresja lamininy a <i>grading</i>	HEV	35	0,1100	0,5293
	typowe	35	0,2623	0,1280
	∑ HEV i typowe	35	0,2154	0,2139
Ekspresja VEGF a <i>grading</i>	HEV	19	0,0448	0,8557
	typowe+naciek zapalny	42	0,0159	0,9202
	∑ HEV; typowe+ naciek zapalny	42	0,0455	0,7746

**Objaśnienia:** n - liczba badanych preparatów; r - współczynnik korelacji Spearmana; p - poziom istotności; ∑ - suma; czerwoną czcionką zaznaczono wartości współczynnika r, dla których p<0,05

## 15.2. Pacjenci ze „zdrowym” przyzęciem (grupa kontrolna K1)

Wyniki korelacji Spearmana pomiędzy ekspresją markerów w naczyniach krwionośnych i nasileniem zmian zapalnych dziąsła pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem przedstawia Tabela 35. Zgodnie z przewidywaniami, nie wykazano w tej grupie badanych dziąseł żadnych korelacji pomiędzy aktywnością zapalną (*grading* z reguły o małym nasileniu) a komórkową ekspresją markerów naczyniowych, wykazywanych głównie w typowych naczyniach krwionośnych dziąsła.

**Tabela 35.** Wyniki korelacji porządku rang Spearmana pomiędzy ekspresją markerów naczyń obliczanych morfometrycznie (% reakcji) we wszystkich typach naczyń krwionośnych a *grading* w dziąsłach pacjentów kontrolnych (grupa K1).

Korelacje cech statystycznych	Typ naczyń	n	r	p
Ekspresja CD34 a <i>grading</i>	HEV	3	-	-*
	typowe	14	-0,1106	0,7067
	∑ HEV i typowe	14	-0,0467	0,8741
Ekspresja PECAM-1 a <i>grading</i>	HEV	2	-	-*
	typowe	6	0,2070	0,6939
	∑ HEV i typowe	6	0,0000	1,0000
Ekspresja endogliny a <i>grading</i>	HEV	4	-	-*
	typowe	15	0,1191	0,6725
	∑ HEV i typowe	15	0,0411	0,8842
Ekspresja ICAM-1 a <i>grading</i>	HEV	2	-	-*
	typowe	6	0,6211	0,1882
	∑ HEV i typowe	6	0,4140	0,4144
Ekspresja kolagenu IV a <i>grading</i>	HEV	1	-	-*
	typowe	7	0,1443	0,7575
	∑ HEV i typowe	7	0,1443	0,7575
Ekspresja lamininy a <i>grading</i>	HEV	2	-	-*
	typowe	7	0,2887	0,5301
	∑ HEV i typowe	7	0,0000	1,0000
Ekspresja VEGF a <i>grading</i>	HEV	2	-	-*
	typowe+naciek	7	0,1800	0,6993
	∑ HEV i typowe+naciek	7	0,1800	0,6993

**Objaśnienia:** n - liczba badanych preparatów; r - współczynnik korelacji Spearmana; p - poziom istotności; ∑ - suma; \*- za małą liczebność jednej z porównywanych grup do wnioskowania statystycznego

## 16. Analiza indeksu angiogenetycznego (stosunek ekspresji endogliny/PECAM-1 oraz VEGF/PECAM-1, AR)

Istotnie większym stosunkiem sumarycznej ekspresji endogliny/PECAM-1 (AR) cechowały się naczynia krwionośne w dziąsłach pacjentów z CP w stosunku do naczyń grupy kontrolnej ze „zdrowym” przyzęciem (K1). Natomiast nie było różnic istotnych biorąc pod uwagę AR w dziąsłowych HEV dziąseł i HEV odczynowych węzłów chłonnych (K2) (Tabela 36, Rycina 16).

Podobnie wykazano istotnie większy indeks angiogenetyczny wyrażony stosunkiem sumarycznej ekspresji VEGF/PECAM-1 w dziąsłach pacjentów z CP w stosunku do naczyń grupy kontrolnej ze „zdrowym” przyzęciem (K1) (Tabela 37, Rycina 16).



**Tabela 36.** Porównanie stosunku sumarycznej ekspresji endogliny do PECAM-1 (wskaźnik angiogenetyczny, AR) pomiędzy CP i K1 oraz porównawczy AR w HEV działa pacjentów z CP i w HEV odczynowych węzłów chłonnych (K2) (test Manna-Whitney'a).

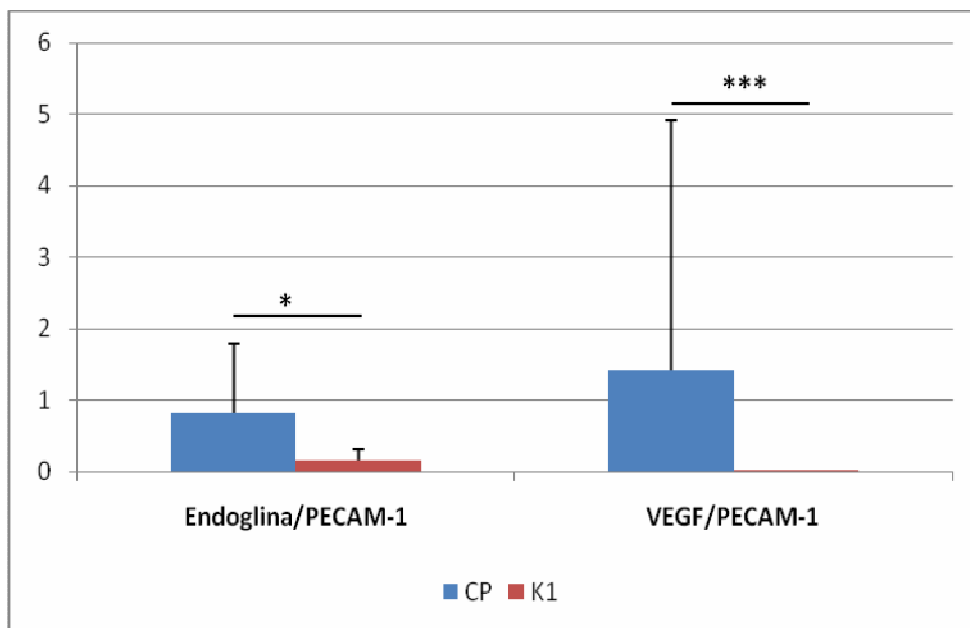
Grupa pacjentów		Endoglina/PECAM-1				
		n	średnia	minimum	maksimum	SD
CP	naczynia typowe	26	0,77	0,00	4,28	1,03
	HEV	24	0,90	0,03	4,47	1,07
	suma naczyń	25	0,81	0,02	4,40	0,98
K1	naczynia typowe	6	0,16*	0,00	0,43	0,16
	suma naczyń	6	0,15**	0,00	0,43	0,16
K2 (HEV)		7	1,95***	0,01	6,76	2,36

**Objaśnienia:** CP- przewlekłe zapalenie przyzębia; K1 - grupa kontrolna 1 – pacjenci ze „zdrowym” przyzęciem”; K2 – grupa kontrolna 2 – pacjenci z odczynowymi węzłami chłonnymi; n – liczba pacjentów; \* -  $p=0,0619$  pomiędzy CP (typowe) i K1 (typowe); \*\* -  $p=0,0123$  pomiędzy CP (suma) i K1 (suma); \*\*\* -  $p=0,3236$  pomiędzy CP i K2 (wyłącznie w HEV)

**Tabela 37.** Porównanie stosunku sumarycznej ekspresji VEGF do PECAM-1 (wskaźnik angiogenetyczny, AR) we wszystkich grupach pacjentów (CP, K1 i K2) (test Manna-Whitney'a).

Grupa pacjentów		VEGF/PECAM-1				
		n	średnia	minimum	maksimum	SD
CP		26	1,42*	0,00	16,47	3,50
K1		7	0,00**	0,00	0,01	0,00
K2		6	0,01***	0,00	0,04	0,02

**Objaśnienia:** CP- przewlekłe zapalenie przyzębia; K1 - grupa kontrolna 1 – pacjenci ze „zdrowym” przyzęciem”; K2 – grupa kontrolna 2 – pacjenci z odczynowymi węzłami chłonnymi; n – liczba pacjentów; \* -  $p=0,0071$  pomiędzy CP i K1; \*\* -  $p=0,9452$  pomiędzy K1 i K2; \*\*\* -  $p=0,0059$  pomiędzy CP i K2



Rycina 16. Porównanie stosunku sumarycznej ekspresji endogliny/PECAM-1 oraz VEGF/PECAM-1 (wskaźnik angiogenetyczny, AR) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) i pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (K1) (test Manna-Whitneya); \* -  $p=0,0123$ ;\*\*\* -  $p=0,0071$ .

## VI. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Badania obecne już z zastosowaniem rutynowego barwienia hematoksyliną i eozyną potwierdzają występowanie licznych żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP) w porównaniu z zaledwie pojedynczymi HEV w dziąsłach 2/15 pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem (grupa K1). Opisy morfologii naczyń typu HEV (nazywanych niekiedy *HEV-like*) w tkance łącznej dziąsła pacjentów z CP znaleziono w licznych pracach z piśmiennictwa rodzimego i zagranicznego [70, 80, 108, 181, 216, 218, 219] oraz wzmiankują o nich inne prace doktorskie [70, 108]. Można potwierdzić, że obraz świetlno-mikroskopowy HEV znajdujących w dziąsłach pacjentów badanych w tej pracy jest w większości zgodny z danymi z piśmiennictwa. Dodatkowo dysponowano grupą kontrolną K2 (odczynowe węzły chłonne), z obecnością HEV o typowej budowie. Badania obecne pozwoliły na zbadanie cech fenotypowych tych naczyń poprzez porównanie immunocytochemicznej ekspresji markerów błonowych komórek wysokiego śródbłonka (HEC) oraz białek błony podstawnej *endothelium* HEV. Zbadano również ekspresję śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), o potencjalnej roli w powstawaniu tego typu naczyń w zapalnie zmienionych tkankach przyzębia. Można również stwierdzić, iż wykazane w obecnej pracy różnice w ekspresji markerów naczyniowych pomiędzy dziąsłami pacjentów z CP i kontrolnymi, pośrednio odzwierciedlają zmiany w liczbie naczyń krwionośnych zwłaszcza u pacjentów z bardziej zaawansowanymi formami CP. Można także potwierdzić dane literaturowe opisujące, iż proliferacja dotyczy zwłaszcza naczyń krwionośnych o małej średnicy (włośniczki, żyłki, małe tętniczki). Zwiększona liczba mikronaczyń obserwowana w obecnych badaniach dominowała w obszarze podnabłonkowym, a naczynia typu HEV były obecne zarówno pod nabłonkiem, jak i w głębszych warstwach *lamina propria*. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy proliferację naczyń dziąsłowych w CP obserwowali głównie pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej [22].

### **Analiza ekspresji markerów błonowych komórek śródbłonka naczyń krwionośnych dziąsła**

Badania w ramach obecnej pracy potwierdziły lokalizację powierzchniowych markerów naczyń krwionośnych (CD34, CD31, endogлина, ICAM-1) we wszystkich typach naczyń krwionośnych, niezależnie od średnicy naczynia i to zarówno w dziąsłach kontrolnych, dziąsłach pacjentów z CP, jak i w odczynowych węzłach chłonnych.

Największą sumaryczną ekspresją wśród wszystkich badanych markerów w dziąsłach pacjentów z CP oraz pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem cechowały się cząsteczki CD34 i CD31 (PECAM-1). W komórkach śródbłonna HEV dziąsła wykazano istotnie większą średnią ekspresję CD34 w porównaniu z naczyniami zwykłymi, natomiast ekspresja CD31 nie różniła się pomiędzy HEV i naczyniami zwykłymi u pacjentów z CP.

Jak opisano szczegółowo we Wstępie pracy, cząsteczka CD34 stanowi marker przede wszystkim hematopoetycznych komórek macierzystych, ale jej ekspresję wykazuje się także w wielu innych komórkach organizmu, przede wszystkim w komórkach śródbłonna małych naczyń krwionośnych [5]. Dowiedziono przy tym, iż w komórkach śródbłonna największa ekspresja cząsteczki dotyczy powierzchni zwróconej do światła naczynia [12], co dało się zaobserwować także w materiale tkankowym zebranym w ramach obecnej pracy. Cząsteczka CD34 podobnie jak CD31, bierze udział w organizacji szkieletu komórkowego, co warunkuje adhezję leukocytów do śródbłonna i ich migrację do tkanek w odpowiedzi na antygeny bakteryjne lub inne czynniki biologiczne [5]. Z funkcjonalnego punktu widzenia jej rola jako adresyny zaznacza się we wczesnych etapach kaskady adhezyjnej, gdyż stanowi ona ligand dla selektyny L obecnej na leukocytach. Nasiloną ekspresją cząsteczki CD34 jest utrzymana w komórkach *endothelium* zlokalizowanych w pobliżu toczącego się procesu zapalnego, co jest zgodne z postulowaną rolą w „kierowaniu” ruchem leukocytów [63].

Badania obecne potwierdziły ekspresję CD34 zarówno przez komórki wysokiego śródbłonna żylnego (HEC), jak i płaskiego śródbłonna typowych naczyń dziąsła pacjentów z CP. Reakcję immunocytochemiczną na CD34 w HEV dziąsłowych zweryfikowano wykonaniem identycznych badań w naczyniach HEV odczynowych węzłów chłonnych. Nasilenie ekspresji CD34 nie różniło się istotnie pomiędzy grupami. Może to pośrednio dowodzić roli CD34 w interakcjach komórek układu odpornościowego (limfocyty, neutrofile) z komórkami śródbłonna także w HEV dziąsła [13, 63].

Ewidentna ekspresja CD34 na dziąsłowych pozawłosowatych żyłkach HEV sugeruje większe podobieństwo tych naczyń do HEV narządów limfatycznych niż do żyłek pozawłosowatych w innych narządach nielimfatycznych (skóra, błony śluzowe), które cechują się występowaniem śródbłonna płaskiego oraz negatywną ekspresją CD34 [63].

W ramach obecnej pracy wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją cząsteczki CD34 (w naczyniach HEV) i aktywnością zapalną dziąsła (*grading*) u pacjentów z CP. Pośrednio może to dowodzić wpływu antygenów bakteryjnych i/lub cytokin prozapalnych na produkcję tego markera komórek śródbłonna. Wykrywając liczne CD34-pozytywne komórki śródbłonna w CP potwierdzono wyniki analiz autorów, wykazujących proliferację

naczyń (i samych komórek śródbłonna) w tym schorzeniu [113] oraz obserwując obniżenie ekspresji CD34 po 12-miesięcznym leczeniu przerostu dziąseł [1]. Często w swoich badaniach nad zmianami naczyniowymi w CP, autorzy prac wiązali więc cząsteczkę CD34 z proliferacją naczyń, nasileniem zmian zapalnych, zmniejszaniem liczby naczyń krwionośnych w tkance wraz z ustępowaniem zmian zapalnych dziąseł po leczeniu [1, 18, 113].

Interpretując wyniki obecnej pracy dotyczące ekspresji komórkowej PECAM-1 (CD31) należy podkreślić, że podobnie jak w badaniach innych autorów [173], ekspresję tego antygeny u pacjentów z CP wykazano głównie w komórkach śródbłonna, choć pozytywna reakcja była widoczna także w komórkach nacieku zapalnego w *lamina propria* dziąsła tej grupy chorych. Lokalizacja komórkowa poza komórkami śródbłonna jest zgodna z demonstrowaną przez innych autorów, a dotyczy m.in. monocytów, limfocytów, granulocytów, keratynocytów i płytek krwi [58, 62, 159, 163, 175].

Ekspresja PECAM-1 dotycząca komórek śródbłonna widoczna była we wszystkich typach naczyń dziąsła, niezależnie od średnicy i budowy histologicznej. Pod względem ilościowym ekspresja tego markera w śródbłonku HEV i śródbłonku płaskim zwykłych naczyń dziąsła była zbliżona. Nie udało się wykazać na poziomie mikroskopu świetlnego, by antygen ten lokalizował się w szczególnie uprzywilejowanych częściach błon komórkowych np. w obrębie połączeń międzykomórkowych, co jest opisane w piśmiennictwie [127, 180]. Można jednak potwierdzić występowanie typowej luminalnej lokalizacji CD31 oraz obecności pozytywnej reakcji immunocytochemicznej także w bocznych powierzchniach błon niektórych HEC. Badania obecne wykazały także, że istotnie większej aktywności zapalnej (*grading* 3) wycinków dziąseł, towarzyszyła większa śródbłonna ekspresja CD31 w typowych naczyniach dziąsła pacjentów z CP (Tabela 19). Nie obserwowano takiej zależności w przypadku dziąsłowych żyłek z wysokim śródbłonkiem. Mogłoby to sugerować, że ekspresja cząsteczki PECAM-1 w wysokim śródbłonku żyłek, które uczestniczą w migracji leukocytów (narządy nielimfatyczne) nie zmienia się istotnie pod wpływem mediatorów zapalnych, co znajduje odzwierciedlenie w piśmiennictwie [63].

Sumaryczna ekspresja CD31 w dziąsłach pacjentów z CP była istotnie wyższa w porównaniu z analogiczną ekspresją tego antygeny w dziąsłach pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem oraz w odczynowych węzłach chłonnych. Różnica w ekspresji CD31 pomiędzy dziąsłami pacjentów z CP (wyższa) i pacjentami bez klinicznych oznak choroby przyzębia

(niższa) jest zrozumiała. Spowodowana jest mniejszą liczbą naczyń krwionośnych w zdrowym dziąśle oraz mniejszą liczbą komórek nacieków zapalnych. Natomiast istotnie większa ekspresja CD31 w dziąsłowych HEV w porównaniu z HEV odczynowych węzłów chłonnych, świadczyć może o szczególnej nadekspresji tego białka w przewlekłym zapaleniu przyzębia *in vivo*. Nie da się wykluczyć roli CD31 w angiogenezie i w formowaniu *de novo* naczyń typu HEV dziąsła w przewlekłym zapaleniu przyzębia.

Dokładna rola cząsteczki CD31 w przewlekłych zapaleniach u człowieka jest wciąż tematem badań. Najczęściej wiązana jest ze stabilizowaniem budowy i adhezją śródbłonnków (zwłaszcza naczyń żylnych) do leukocytów i udziałem w diapedezie tych komórek przez ścianę naczyń HEV [63, 118, 191]. Najwyższą ekspresję opisuje się właśnie w komórkach śródbłonka, gdzie jej ilość dochodzi do prawie miliona cząsteczek w komórce [210]. Inni autorzy donoszą o roli tej glikoproteiny w angiogenezie i stosują ten marker wraz z cząsteczką CD105 (endoglina) do ustalania tzw. wskaźnika angiogenezy w nowotworach ludzkich [21, 168]. Wskaźnik taki wyliczono na podstawie ekspresji CD31 oraz endogliny także w ramach obecnej pracy i będzie omówiony w części Dyskusji poświęconej ekspresji endogliny.

Na podstawie badań ekspresji PECAM-1 w przewlekłym zapaleniu przyzębia u pacjentów analizowanych w tej pracy, wydaje się, iż ekspresja PECAM-1 jest dobrym markerem wszystkich rodzajów naczyń występujących w dziąśle, a ilościowo największa w HEV dziąsłowych spełnia najpewniej dodatkową rolę. Niestety nie można odwołać się do wielu prac z piśmiennictwa dotyczących CP. Właściwie jedynie Gemmel i wsp. (1994) badał ekspresję tkankową cząsteczek adhezyjnych w *periodontitis*, w tym PECAM-1 i potwierdził lokalizację tej cząsteczki w naciekowych limfocytach oraz komórkach śródbłonka [58]. Badania Yun i wsp. (2005) przeprowadzone były na hodowanych komórkach śródbłonka z żyły pępowinowej (HUVEC). Na modelu tym obserwowano, że dodawanie do hodowli HUVEC aktywnych gingipain wytwarzanych przez *P. gingivalis*, prowadziło do zmniejszenia ekspresji PECAM-1 na bocznych powierzchniach komórek śródbłonka. Miałoby to ułatwiać powstawanie szczelin pomiędzy tymi komórkami i zwiększać przenikanie leukocytów do tkanek otaczających. Następstwem działania gingipain była także śmierć komórek śródbłonka w procesie apoptozy. Autorzy postulują, iż proces ten może występować także *in vivo* w tkankach dotkniętych zapaleniem przyzębia i jest kluczowy dla rozwoju i progresji choroby [210]. Konkluzje tej pracy są jednak mało zrozumiałe w świetle dostępnej wiedzy [63]. Cząsteczka CD31 bierze udział w aktywacji limfocytów do produkcji

wielu enzymów (m.in. proteaz serynowych) oraz innych cząsteczek adhezyjnych (m.in. integryny  $\alpha\beta 1$  wiążącej białka błony podstawnej), które umożliwiają leukocytom poruszanie się w przestrzeniach międzykomórkowych [63]. Właśnie odpowiednie stężenie cząsteczki CD31, a nie jego redukcja (poprzez działanie wspomnianych gingipain) ma znaczenie w sprawnej diapedezie leukocytów. Nie można więc w pełni odnieść wyników pracy tego autora do uzyskanych w ramach obecnych badań.

Obok CD31, do nadrodziny immunoglobulin należy również, badana w tej pracy cząsteczka ICAM-1 (CD54) [189]. W prawidłowych węzłach chłonnych odgrywa istotną rolę w późniejszych etapach kaskady adhezyjnej z udziałem żyłek z wysokim śródbłonkiem [63]. Podobnie jak PECAM-1, cząsteczka ta może ulegać ekspresji w wielu typach komórek, m. in. w komórkach śródbłonka naczyń. Liczne substancje generowane w stanie zapalnym zwiększają ekspresję cząsteczki ICAM-1 na powierzchni śródbłonka [63].

Badanie roli ICAM-1 w patogenezie chorób przyzębia w odróżnieniu od innych markerów, analizowanych w tej pracy, było częściej podejmowane [31, 36, 58, 69, 174]. Analizowano zarówno postać rozpuszczalną tej glikoproteiny (sICAM-1), jak i ekspresję komórkową w tkankach przyzębia. Pozytywna reakcja immunocytochemiczna obserwowana była w różnych typach komórek w dziąśle (komórki nabłonka dziąsła/kieszonki przyzębnej, śródbłonek naczyń, leukocyty nacieków zapalnych). Stosując ekspresję ICAM-1 jako „znacznik” naczyń krwionośnych dziąsła w przewlekłym stanie zapalnym oraz kontroli, wykazano, że porównywane tkanki mają podobną gęstość naczyń [31].

Badania w obecnej pracy nastawione na określenie nie liczby naczyń krwionośnych, a nasilenie ekspresji markerów, wykazały obecność ICAM-1 we wszystkich typach badanych naczyń krwionośnych dziąseł kontrolnych (K1), zapalnie zmienionych (CP) oraz w HEV odczynowych węzłów chłonnych (K2). Ilościowa analiza wykazała różnice statystycznie istotne jedynie pomiędzy całkowitą ekspresją tego markera w grupie CP i K1, na korzyść grupy pacjentów z CP. Nie notowano natomiast istotnych różnic pomiędzy ekspresją w HEV dziąseł z CP i odczynowych węzłów chłonnych. Porównując ilościowo średnią ekspresję ICAM-1 w stosunku do innych markerów HEV u pacjentów z CP, ekspresja ta była podobna do ekspresji endogliny (stosunkowo nieduża), istotnie mniejsza w stosunku do ekspresji CD34 i PECAM-1. Ekspresję komórkową ICAM-1 lokalizowano głównie w komórkach śródbłonka naczyń, choć również w pojedynczych komórkach nacieków zapalnych (limfocyty, monocyty). Nie obserwowano ekspresji ICAM-1 w keratynocytach nabłonka

dziaśła. Trudno więc odnieść się do prac, które analizując ekspresję nabłonkową ICAM-1 dowodzą spadku produkcji ICAM-1 przez ludzkie dziąsłowe keratynocyty jamy ustnej pod wpływem gingipain *P. gingivalis* [169]. Praca ta sugerowała rolę ICAM-1 w początkowych stadiach rozwoju chorób przyzębia. Obniżenie ekspresji ICAM-1 w wyniku bezpośredniej proteolizy cząsteczki, miałyby doprowadzać do zniszczenia interakcji komórek nabłonka i wewnątrz nabłonkowych leukocytów i ułatwić inwazję bakterii do tkanek przyzębia [169]. Znaczenie korelacji pomiędzy ekspresją ICAM-1 w keratynocytach nabłonka i czynnikiem bakteryjnym w początkowych fazach zapalenia przyzębia potwierdzają także badania Tamai i wsp. (2005) [172]. Z kolei analiza ekspresji ICAM-1 w hodowanych komórkach śródbłonka naczyń pokazała, że pod wpływem gingipain *P. gingivalis* następuje wzrost ekspresji ICAM-1 w zależności od stosowanej dawki i wirulencji szczepu bakteryjnego. Podkreśla to rolę endotelialnej lokalizacji ICAM-1 w procesach immunologicznych [212]. Model ten jedynie częściowo można odnieść do zjawisk obserwowanych *in vivo*, także w materiale tkankowym od pacjentów z CP zebrany w tej pracy. Analiza statystyczna nie ujawniła korelacji pomiędzy ekspresją ICAM-1 i nasileniem zmian zapalnych (*grading*), wartościami CAL czy postacią zapalenia przyzębia (zlokalizowana/uogólniona). W piśmiennictwie pozytywną korelację pomiędzy ekspresją ICAM-1 i nasileniem zmian zapalnych opisano dla lokalizacji tej cząsteczki w komórkach nabłonka, a nie w komórkach *endothelium* [58].

Obecna praca wykazała natomiast liczne pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją ICAM-1 i ekspresją pozostałych markerów naczyniowych w HEV pacjentów z CP. I tak odnotowano pozytywną korelację cząsteczek należących do nadrodziny immunoglobulin (ICAM-1 i PECAM-1). Dodatkowo w HEV pacjentów z CP ekspresja ICAM-1 rosła wraz z ekspresją cząsteczki CD34 i endogliny oraz była pozytywnie skorelowana z ekspresją kolagenu IV w błonach podstawnych komórek wysokiego śródbłonka HEV. Zdecydowanie mniej pozytywnych korelacji obserwowano pomiędzy ekspresją ICAM-1 w typowych naczyniach dziąsła pacjentów z CP. Co warto zaznaczyć, w dziąsłach „zdrowych” nie udało się wykazać żadnych istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją ICAM-1 i ekspresją pozostałych badanych markerów.

Kolejnym badaniem w obecnej pracy markerem komórek śródbłonka małych naczyń krwionośnych (włośniczek, tętniczek i żyłek) była endoglina (CD54). Należy do istotnych markerów neoangiogenezy w szlaku sygnalizacyjnym TGF- $\beta$  [19, 63, 77]. Produkowana jest głównie przez komórki śródbłonka naczyń oraz aktywowane monocyty [63]. Ekspresja



endogliny wykrywana była częściej na HEC niż na komórkach płaskiego śródbłonka naczyń [77].

W badanym w ramach obecnej pracy materiale tkankowym, ekspresję endogliny (CD105) zlokalizowano zarówno w naczyniach krwionośnych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, jak i w tkankach obu grup kontrolnych. Istotnie większa ekspresja CD105 dotyczyła naczyń krwionośnych obecnych w dziąsłach pacjentów z CP w porównaniu z naczyniami dziąseł pacjentów ze „zdrowym” przyzębiem (K1). Natomiast nie ujawniono znamiennych różnic pomiędzy ekspresją tej glikoproteiny na błonach komórek śródbłonka HEV w dziąsłach pacjentów z CP i w komórkach śródbłonka HEV w odczynowych węzłach chłonnych. Średnia ekspresja endogliny w HEV dziąseł pacjentów z CP była ilościowo niższa od ekspresji dwóch pozostałych markerów błonowych, tj. CD34, PECAM-1 (CD31), a porównywalna z ekspresją ICAM-1. Badania obecnej pracy można pośrednio odnieść do analizy profilu ekspresji genów charakterystycznych dla HEC, opisanych przez Izawę i wsp. (1999) [77]. Badania te dotyczyły izolowanych z węzłów chłonnych myszy, oczyszczonych komórek wysokiego śródbłonka. Opierały się o inne niż stosowane w obecnej pracy, techniki biologii molekularnej (m.in. analiza RT-PCR, hodowla komórkowa, analiza fenotypu komórek w cytometrze przepływowym). Autor ten wykazał częściowe podobieństwo ekspresji genów charakterystycznych dla HEC i CD31-pozytywnych komórek płaskiego śródbłonka, ale wyraźnie odmiennych w porównaniu z limfocytami T (CD4+ i/lub CD8+) i limfocytami B (B220+). Wspólny profil genowy markerów dla obu typów śródbłonek (tj. wysokiego i płaskiego) obejmował następujące markery: endoglinę, CD32, CD63, L6 antygen oraz ICAM-1 [77]. Podobnie w obecnej pracy wykazano, że wspólnymi markerami komórek śródbłonka HEC i śródbłonka płaskiego (CD31+) typowych naczyń krwionośnych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym schorzeniem przyzębia jest właśnie endoglina (CD105) i ICAM-1 oraz dodatkowo CD34. Jednak badania obecne, inaczej niż Izawy i wsp. (1999) [77] wykazały istotnie niższą średnią ekspresję endogliny w dziąsłowych HEV w porównaniu z CD34 i CD31 w tych samych naczyniach dziąseł. W odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2) nasilenie ekspresji endogliny nie różniło się istotnie od ekspresji pozostałych markerów powierzchniowych HEV.

Brakuje w dostępnym piśmiennictwie prac dotyczących roli endogliny w procesach zapalnych przyzębia. Badano wprawdzie jej ekspresję także z zastosowaniem metod immunohistochemicznych w komórkach śródbłonka naczyń, ale obecnych w miazdze zęba u pacjentów z CP. Wykazano zmienną w nasileniu, komórkową ekspresję zarówno u

pacjentów z CP, jak i w kontroli bez istotnych korelacji z ekspresją innych cząsteczek adhezyjnych i prawdopodobnie niezależną od nasilenia zmian zapalnych [178].

Badania obecne wykazały wysokie pozytywne korelacje pomiędzy ekspresją komórkową endogliny i dwóch innych markerów błonowych tj. CD34 oraz ICAM-1. Ekspresja tego białka błonowego korelowała także z ekspresją kolagenu IV w błonach podstawnych komórek śródbłonka HEV u pacjentów z CP. Świadczyłoby to o potencjalnych funkcjonalnych zależnościach endogliny z innymi białkami produkowanymi przez komórki śródbłonka naczyń. Dokładne określenie roli endogliny w dziąsłach pacjentów z CP, wymagałoby dalszych badań z zastosowaniem dodatkowych modeli badawczych. Nie wykazano bowiem żadnych istotnych statystycznie powiązań pomiędzy ekspresją endogliny u pacjentów z CP a wybranymi danymi klinicznymi (postać choroby, *grading*, CAL). Należy jednak przypomnieć, że średnia ekspresja tej glikoproteiny w naczyniach dziąsła pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym tkanek przyzębia (grupa badana) była istotnie wyższa niż u pacjentów z klinicznie zdrowym przyzęciem. Nie da się więc wykluczyć udziału procesu zapalnego, zniszczenia części naczyń krwionośnych czy innych mechanizmów nasilenia syntezy tej glikoproteiny w komórkach śródbłonka naczyń dziąsłowych w CP. Sprecyzowanie dokładnego wpływu mediatorów zapalnych na ekspresję endogliny wymagałoby jednak badań czynnościowych w innym modelu badawczym. Podobna pod względem ilościowym ekspresja CD105 w HEV dziąseł i HEV z narządów limfatycznych, sugeruje że spełnia ona rolę w kaskadzie adhezyjnej i migracji leukocytów do tkanek także w narządach pozalimfatycznych (dziąsła pacjentów z CP).

Endoglina nie może jednak służyć za specyficzny marker dziąsłowych HEC ani komórek wysokiego śródbłonka w żyłkach narządów limfatycznych. Wykazano ją bowiem także w śródbłonku płaskim naczyń krwionośnych dziąsła, choć ekspresja w tych ostatnich naczyniach była znamienne niższa w porównaniu z HEC u pacjentów z CP. Porównanie wzajemnej średniej ekspresji endogliny i pozostałych antygenów naczyniowych w dziąsłach pacjentów z CP wykazało, że ekspresja endogliny była jedną z najniższych ekspresji (obok ICAM-1) ze wszystkich badanych cząsteczek błonowych śródbłonka, istotnie wyższą jedynie od ICAM-1. W dziąsłach pacjentów z klinicznie zdrowym przyzęciem (gdzie nie obserwowano prawie w ogóle HEV), naczyniowa ekspresja endogliny w komórkach płaskiego śródbłonka była zdecydowanie najniższa z wszystkich badanych błonowych markerów tych komórek. Mimo to w tej grupie pacjentów (K1) wykazano bardzo silną (współczynnik korelacji Spearmana  $r=0,8$ ) i jedyną istotną statystycznie korelację pomiędzy ekspresją endogliny i PECAM-1.

Zakładając potencjalny udział endogliny i PECAM-1 (CD31) w neoangiogenezie, dla dokładniejszego scharakteryzowania ekspresji tych cząsteczek w komórkach *endothelium* naczyń w u badanych pacjentów, za pracą Tachezy i wsp. (2010) [168], obliczono stosunek całkowitej ekspresji komórkowej endogliny do PECAM-1 (indeks proliferacyjny, AR). Istotnie większym AR cechowały się naczynia w dziąsłach pacjentów ze zmianami zapalnymi w stosunku do naczyń dziąsła pacjentów bez zmian zapalnych w przyzębiu (grupa K1). Natomiast nie obserwowano istotnych różnic w AR obliczanym wyłącznie w HEV dziąseł z CP i HEV odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2). Nie notowano także różnic w indeksie angiogenetycznym pomiędzy grupą CP i pacjentami ze „zdrowym” przyzębiem, biorąc pod uwagę stosunek ekspresji endoglina/PECAM-1 w naczyniach zwykłych w obu badanych grupach ( $p=0,0619$ ). Różnice w sumarycznym AR pomiędzy pacjentami z przewlekłym zapaleniem przyzębia i grupą kontrolną ze „zdrowym” przyzębiem wydają się więc być uwarunkowane obecnością naczyń typu HEV w dziąsłach zmienionych zapalnie i zwiększeniem tym samym ekspresji markerów tych naczyń.

Postanowiono sprawdzić także jak zachowuje się indeks całkowitej ekspresji VEGF/PECAM-1, biorąc pod uwagę dowiedziony wpływ indukcyjny VEGF na angiogenezę *in vivo* oraz udział tego czynnika wzrostu w tworzeniu (w pewnych warunkach) naczyń żylnych [101]. Okazało się, że AR zdefiniowany w ten sposób wykazuje jeszcze większe różnice w porównaniu z AR, określonym jako stosunek endoglina/PECAM-1 w grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i to zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej K1, jak i K2. Zaskakująco niską, prawie nieuchwytną ekspresją VEGF cechowały się odczynowe węzły chłonne, co spowodowało także niską wartość całego indeksu VEGF/PECAM-1. Wyniki te pośrednio wskazują na istotną rolę badania współczynnika angiogenetycznego dla ujawnienia zwiększonej angiogenezy w przewlekłych stanach zapalnych, w których pojawiają się nowe naczynia, w tym żyłki z wysokim śródbłonkiem. Porównawalny AR wyrażony stosunkiem ekspresji endoglina/PECAM-1 w naczyniach typu HEV z różnych narządów (dziąsła, węzły chłonne) może poza tym potwierdzić podobieństwo funkcji obu badanych cząsteczek w angiogenezie oraz w migracji leukocytów.

### **Analiza ekspresji markerów błony podstawnej komórek śródbłonka naczyń krwionośnych dziąsła**

Ekspresja tkankowa najważniejszych pozakomórkowych składników budulcowych błon podstawnych, w tym błon podstawnych *endothelium* naczyń krwionośnych, dotyczyła w obecnej pracy dwóch białek – kolagenu typu IV oraz lamininy. Należy podkreślić, iż spośród

wszystkich badanych antygenów, ekspresja lamininy (obok PECAM-1) należała do najintensywniej zaznaczonych w obrazach mikroskopowych antygenów związanych z komórkami *endothelium* i to niezależnie od typu naczynia, jak i badanego narządu. Lokalizacja komórkowa lamininy w obrębie błon podstawnych *endothelium* oraz błon podstawnych komórek nabłonka kieszonki przyzębnej są zgodne z wynikami badań innych autorów [162]. W badanych fragmentach dziąsła pacjentów z CP silniejszą reakcję immunocytochemiczną wykazywano dla lamininy w porównaniu z kolagenem IV i również ten pierwszy marker bardziej podkreślał liniowy układ błony podstawnej nabłonka kieszonki przyzębnej. Lokalizacja komórkowa kolagenu IV w badanych fragmentach dziąsła i odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2) dotyczyła niemal wyłącznie błon podstawnych komórek *endothelium*. Bardzo rzadko obserwowano pojedyncze struktury włókienkowe z pozytywną reakcją na to białko rozproszone w tkance łącznej dziąsła i/lub odczynowego węzła chłonnego. Należy dodać, że lokalizacja kolagenu IV była zróżnicowana indywidualnie, od bardzo cienkiej linii „markującej” błonę podstawną naczyń czy nabłonek kieszonki przyzębnej, do wyraźnie poszerzonej struktury macierzy pozakomórkowej w obszarach ich normalnego występowania. Jest to zgodne z pracą Peng i wsp. (1986), który z zastosowaniem metody immunofluorescencyjnej zlokalizował kolagen IV w błonach podstawnych nabłonka dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Zmiany polegające na ścieńczeniu, częściowych lub całkowitych ubytkach ekspresji tego białka dotyczyły głównie błon podstawnych szczytowych części kieszonek przyzębnych [144]. Podobnie badania ultrastrukturalne Chavriera i Couble'a (1989) zlokalizowały kolagen typu IV wyłącznie w *lamina densa* błony podstawnej i potwierdziły degradację tej struktury u pacjentów z progresywnym zapaleniem przyzębia [29]. Komórkowa lokalizacja lamininy w obecnej pracy lepiej niż kolagenu IV, uwidaczniała poszerzenie błon podstawnych komórek śródbłonka, często rozdętych naczyń włosowatych i żyłek, w tym także HEV.

Analiza ilościowa u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia wykazała istotnie większą ekspresję właśnie lamininy w porównaniu z kolagenem IV i to zarówno w błonach podstawnych poszczególnych typów naczyń, jak i biorąc pod uwagę sumaryczną ekspresję tego markera. Większa ekspresja lamininy w HEV pacjentów z CP w porównaniu z ekspresją kolagenu IV, może świadczyć pośrednio o istotnej roli zwłaszcza tego składnika budulcowego błon podstawnych w migracji leukocytów poprzez ściany naczyń. Odnośnie wysokiej ekspresji lamininy w dziąsłowych naczyniach krwionośnych w porównaniu z kolagenem IV u pacjentów z CP, należy przytoczyć obserwacje innych badaczy, którzy na hodowanych komórkach śródbłonka wykazali, iż ekspresja lamininy może być regulowana

przez cytokiny i czynniki wzrostowe uwalniane podczas procesu zapalnego [68]. W HEV węzłów chłonnych człowieka wykazano obecność różnych łańcuchów lamininy, z których najważniejszą rolę w biologii limfocytów odgrywa łańcuch alfa 5 (Lm-511) [64]. Ta izoforma lamininy w szczególny sposób promowała adhezję i migrację ludzkich limfocytów, a w warunkach *in vitro* stymulowała zarówno proliferację limfocytów T, jak i produkcję przez te komórki niektórych izoform lamininy [64]. Badanie Lm-511 służy do identyfikacji laminin obecnych w strukturach węzła chłonnego oraz receptorów integrynowych laminin na limfocytach [64].

Analiza statystyczna w obecnej pracy nie wykazała istotnych różnic pomiędzy ekspresją lamininy w HEV dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia a ekspresją tej cząsteczki w HEV odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2), natomiast ekspresja kolagenu IV była istotnie wyższa w HEV grupy K2 w porównaniu z HEV pacjentów z CP. Postulowane funkcje lamininy to także udział w formowaniu nowych naczyń i utrzymaniu stabilności *endothelium* [63], którą to rolę można przypisać temu białku zarówno w naczyniach krwionośnych dziąsła pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym przyzębia, jak i ze „zdrowymi” dziąsłami. Należy wspomnieć o lamininie w barierowej funkcji śródbłonna, warunkowaniu jego wybiórczej przepuszczalności a także jej udziale w przenoszeniu sygnałów w obrębie ściany naczynia. Nadmierna proliferacja naczyń, którą obserwuje się w CP może mieć duże znaczenie w degradacji tkanek przyzębia, głównie poprzez udział w wytwarzaniu okołonaczyniowego materiału hialinowego (szklatego), hamującego migrację granulocytów obojętnochłonnych (pełniących rolę protekcyjną w chorobach przyzębia) przez naczynia krwionośne [146, 216, 217, 219]. Na podstawie wyników obecnych badań, nie da się wykluczyć udziału przede wszystkim lamininy (a nie kolagenu IV) w wytwarzaniu „materiału hialinowego” dookoła żyłek dziąsłowych HEV u pacjentów z CP. Jednak porównywalna ilościowo ekspresja lamininy w HEV dziąsłowych i HEV węzłów chłonnych raczej wyklucza rolę nadekspresji lamininy jako czynnika hamującego transmigrację leukocytów przez ścianę HEV. Warto zaznaczyć, że w odczynowych HEV wykazano większą ekspresję kolagenu IV w porównaniu z HEV dziąsłowymi. W samych HEV węzłów chłonnych ekspresja kolagenu IV nie różniła się od ekspresji lamininy, co sugeruje zróżnicowanie funkcji kolagenu IV w zależności od specyfiki narządowej zapalenia i budowy naczyń krwionośnych w narządach limfatycznych zmienionych zapalnie. Badania na liniach hodowanych komórek śródbłonna mikronaczyń wykazały, iż produkcja obu badanych w tej pracy białek błony podstawnej zachodzi niezależnie [99, 211]. Najpierw produkowana jest laminina. Kolagen typu IV produkowany

jest później i w tym samym czasie, gdy wytwarzane jest światło naczyń krwionośnego [99, 129]. Fizjologiczna rola lamininy i kolagenu typu IV jest dobrze znana i polega przede wszystkim na udziale w przekształcaniu pierwotnych komórek nabłonkowych w charakterystyczne struktury cewkowe oraz na utrzymywaniu właściwej architektury komórek nabłonka/śródbłonka [94]. Kolagen typu IV występuje w formie sieci o dużej powierzchni zapewniającej mechaniczną stabilność błon podstawnych i będąc strukturą podporową dla komórek nabłonka i śródbłonka. Warunkuje wybiórczą przepuszczalność błon podstawnych [177]. Wraz z lamininą odgrywa istotną rolę w adhezji, różnicowaniu, wzroście oraz regeneracji komórek [7, 8]. Kolagen typu IV jest także najsilniej reprezentowanym białkiem błon podstawnych naczyń HEV migdałków podniebiennych, gdzie nie tworzy jednej warstwy, ale wiele luźniejszych oraz bardziej zbitych ułożonych warstwowo sieci białkowych. Bogata w kolagen IV blaszka podstawna błony podstawnej *endothelium* HEV jest w bezpośrednim kontakcie zarówno z komórką śródbłonka, jak i pozanaczyniowymi limfocytami, uczestnicząc bezpośrednio w migracji limfocytów z naczyń HEV do otaczającej tkanki łącznej [164]. Dodatkowo wykazano, że kolagen IV wiąże ważne w recykulacji limfocytów, chemokiny: CCL21, CXCL12 i CXCL13 oraz inne czynniki wzrostu [209].

W obecnych badaniach, ekspresja kolagenu w błonach podstawnych HEV u pacjentów z CP była istotnie większa w porównaniu z ekspresją w błonach podstawnych „zwykłych” naczyń krwionośnych dziąsła (Tabela 6). Ekspresja lamininy nie różniła się w zależności od typu naczyń. Co ciekawe jednak, nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy ilościową ekspresją żadnego z markerów błony podstawnej pomiędzy pacjentami z CP a tymi ze „zdrowym” przyzęciem (Tabela 13). Wy tłumaczeniem może być fakt, iż w niniejszej pracy obserwowano znaczne różnice indywidualne pomiędzy tzw. klinicznie „normalnymi” dziąsłami, w tym obecność ogniskowych nacieków zapalnych w pojedynczych preparatach kontrolnych. Należy podkreślić, że wykazano zaledwie pojedyncze naczynia HEV i to zaledwie u dwóch pacjentów z całej grupy, stąd praktycznie można było porównywać jedynie sumaryczną ekspresję antygenów naczyniowych w tych grupach pacjentów. Ponadto wiadomo z piśmiennictwa, że nie zawsze istnieje ścisła korelacja pomiędzy badaniem klinicznym a wynikami badania histopatologicznego w przypadku „zdrowego” przyzębia [116, 135]. Nie udało się więc potwierdzić spodziewanej większej ekspresji kolagenu IV i/lub lamininy w błonach podstawnych naczyń krwionośnych w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia w porównaniu ze „zdrowym” przyzęciem. W schorzeniach przyzębia generalnie obserwuje się ubytek

elementów tkanki łącznej dziąsła (w tym kolagenu), ale mechanizm molekularny tych zmian nie jest poznany [24]. Badania biochemiczne grupy Buduneli i wsp. (2001) dotyczące porównania ilości całkowitego kolagenu (w tym typu IV) w tkankach dziąsła w różnych postaciach zapalenia przyzębia, także nie potwierdziły różnicy pomiędzy dziąsłami pacjentów z zapaleniem przyzębia dorosłych (AP) a kontrolnymi dziąsłami. Jedynie w grupie agresywnych zapaleń przyzębia wykazano redukcję całkowitej ilości kolagenu w tkankach [24].

W grupie kontrolnej K2 (odczynowe węzły chłonne) ekspresja kolagenu IV (ale nie lamininy) w przypadku błon podstawnych śródbłonka HEV była istotnie wyższa w porównaniu z ekspresją w błonach podstawnych HEC dziąsłowych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Świadczyłoby to o różnicy w produkcji kolagenu IV przez komórki wysokiego śródbłonka w przypadku „prawdziwych” HEV (większa) w porównaniu do komórek *endothelium* naczyń HEV (*HEV-like*) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (mniejsza). Na podstawie wyników obecnej pracy można jedynie pośrednio potwierdzić (rutynowe barwienie H+E), że błony podstawne zmienionych naczyń krwionośnych w dziąsłach większości pacjentów z CP mają pogrubiałe błony podstawne, jednak nie znalazło to bezpośredniego odbicia w istotnie zwiększonej ekspresji kolagenu IV i/lub lamininy w porównaniu z dziąsłami kontrolnymi. W obecnych badaniach u pacjentów z CP generalnie nie obserwowano ekspresji kolagenu IV i/lub lamininy poza samymi błonami podstawnymi komórek śródbłonka. W odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2) pozytywną reakcję na kolagen IV obserwowano także w strukturach siateczki w zębnie narządów, co potwierdza obserwacje innych autorów [64, 105]. Co do konfrontacji z opisami literaturowymi, należy podkreślić, że dane takie, choć być może lepiej dokumentujące pogrubienie błony podstawnej (mikroskop konfokalny, barwienia podwójne), pochodzą z mniejszych ilościowo grup chorych (10 pacjentów z CP). Grupę z CP porównywano z pacjentami z *gingivitis*, a nie pacjentami ze „zdrowym” przyzęciem, jak w obecnej pracy [28]. Trudno na podstawie obecnych badań ustosunkować się do obserwowanej przez innych autorów, ekspresji kolagenu IV i lamininy także w postaci elementów niezwiązanych bezpośrednio z błonami podstawnymi naczyń tzw. RVBM (ang. *residual vascular basement membrane*) [28, 67]. W obecnej pracy, pojedyncze struktury włóknkowe i/lub komórkowe obecne były również poza naczyniami krwionośnymi, które mogłyby odpowiadać pozanaczyniowemu odkładaniu się białek błony podstawnej czy szczątkowych błon podstawnych naczyń (RVBM), opisywanych w piśmiennictwie [28]. Nie były one poddane analizie ilościowej. Na podstawie analiz mikroskopowych wydaje się

jednak bardziej przekonujące, że białka macierzy pozakomórkowej są fizjologicznie najsilniej związane z błonami podstawnymi. Te zaś występujące w komórkach siateczki i/lub strukturach włóknkowych parenchymy węzłów chłonnych, tworzą dodatkowe „umocnienie” dla włókien siateczkowych [84]. Przestrzenna organizacja *reticular network* zbudowanych z różnych rodzajów białek ma spełniać rolę w transporcie płynów oraz ułatwiać ameboidalny ruch leukocytom wędrującym w obrębie narządów limfatycznych [84]. Grupa Hunter i wsp. (2000) dowodzi, że obserwowane przez nich „resztki” materiału białkowego błon podstawnych poza naczyniami krwionośnymi mogą odgrywać rolę w regeneracji naczyń dziąsła [28], czego nie da się wykluczyć i na podstawie obecnych badań. Wyniki obecnej pracy jedynie częściowo potwierdzają innych autorów w CP [67, 146]. Wykazali oni złogi kolagenu IV i lamininy dookoła naczyń żylnych, ze szczególnie rozbudowaną siecią włókienek kolagenu IV w całych chorobowo zmienionych dziąsłach u pacjentów z CP, z wtórnym osłabieniem reakcji obronnych oraz ograniczeniem procesów regeneracji tkanki [146] oraz dodatkowo zlokalizowanych pozanaczyniowo [67].

### **Analiza ekspresji VEGF w dziąsłach pacjentów z CP**

W obecnej pracy zastosowano monoklonalne mysie anty-ludzkie przeciwciała do jednoczesnego wykrywania trzech izoform VEGF, tzn. VEGF-A (VEGF-121), VEGF-B (VEGF-165) i VEGF-C (VEGF-189). W przewlekłych schorzeniach zapalnych przyzębia ekspresja VEGF była badana dopiero od końca lat 90-tych XX wieku [23]. Z zastosowaniem metod immunocytochemicznych, obecność VEGF wykazano w dość dużym wachlarzu komórek, od *endothelium* począwszy, poprzez neutrofile i komórki plazmatyczne na komórkach nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej skończywszy [23].

W badaniach w niniejszej pracy lokalizacja VEGF najczęściej dotyczyła komórek nacieków zapalnych (limfocyty, makrofagi), obecnych w *lamina propria* dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Potwierdza to częściowo obserwacje tych autorów, którzy intensywną ekspresję VEGF wykazali właśnie w monocytach i makrofagach, choć byli to pacjenci z cukrzycą i chorobami przyzębia [188]. Wyniki moje nie potwierdzają danych z pracy Chapple i wsp. (2000), którzy dominującą ekspresję komórkową VEGF obserwowali w keratynocytach nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej [28].

W ramach tej pracy jedynie pojedyncze komórki śródbłonka naczyń wykazywały pozytywną reakcję na ten czynnik wzrostowy i to prawie wyłącznie komórki *endothelium* HEV, a nie typowych naczyń dziąsła. Zasadniczo nie obserwowano pozytywnej reakcji immunocytochemicznej na VEGF w komórkach nabłonka kieszonki przyzębnej. W



przypadku wycinków dziąseł od pacjentów ze „zdrowym” przyzęciem, ekspresja VEGF była znikoma i dotyczyła pojedynczych komórek płaskiego śródbłonka typowych naczyń krwionośnych dziąsła. Potwierdza to wyniki badań Unlu i wsp. (2003), który również nie obserwował ekspresji VEGF w dziąsłach pacjentów kontrolnych [188]. Pionierskie badania z zastosowaniem metody ELISA do ilościowej oceny stężenia VEGF u pacjentów z *gingivitis* i w kontroli wykazały zwiększone stężenia tego czynnika, które korelowały z głębokością kieszonki przyzębnej (maksymalne stężenia na głębokości 4-6 mm) [80]. Obserwowano przy tym wzrost liczby naczyń krwionośnych oraz większy stosunek VEGF/IL-6 w dziąsłach pacjentów z głębokością kieszonki 4-6 mm w porównaniu ze zdrowym fragmentem dziąsła [80]. Podobne korelacje pomiędzy stężeniem VEGF w płynie dziąsłowym u pacjentów z CP a danymi klinicznymi (m.in. CAL) obserwowali inni autorzy [148].

Badania w obecnej pracy nie wykazały istotnych korelacji pomiędzy ekspresją VEGF a nasileniem zmian zapalnych (*grading*) pacjentów z CP czy wartością parametru CAL.

W naczyniach HEV w węzłach chłonnych zebranych w tej pracy nie obserwowano pozytywnej reakcji na VEGF, a z komórek limfoidalnych, jedynie nieliczne z nich wykazywały pozytywną reakcję. Badania te tylko częściowo potwierdzają obserwacje opisane w pracy Chapple i wsp. (2000), którzy także obserwowali VEGF-pozytywne komórki nacieków zapalnych i naczyń krwionośnych dziąsła w zaawansowanym *periodontitis*, jednak za główne źródło VEGF uznali keratynocyty prawidłowego nabłonka dziąsła [28].

Obecne badania wykazały większą ekspresję VEGF w przypadku pacjentów z CP w porównaniu z grupami kontrolnymi, co mogłoby potwierdzać potencjalny udział lokalnej produkcji VEGF (wykrywanych w tej pracy) w remodelowaniu naczyń krwionośnych dziąsła, w tym być może także w powstawaniu naczyń typu HEV. Nie można natomiast zgodzić się z obserwacją innych autorów, że lokalna produkcja VEGF jest mniejsza w bardziej zaawansowanych zmianach zapalnych przyzębia [23, 28]. Co interesujące u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia obserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją VEGF i lamininy w naczyniach krwionośnych dziąsła. Nie znaleziono jednak odniesienia do tego wyniku badań w dostępnym piśmiennictwie, choć już w latach 90-tych XX wieku wykazano, iż ekspresja VEGF wiąże się zarówno z komórkami śródbłonka naczyń, jak i macierzą pozakomórkową [79, 143]. Opisano w literaturze pozytywną korelację pomiędzy wzrostem przepuszczalności naczyń pod wpływem VEGF i

zewnątrznacyniowym odkładaniem się fibryny, po której mogą migrować komórki śródbłonka [48].

## **Podsumowanie**

W zebranych w tej pracy materiale tkankowym dziąseł i odczynowych węzłów chłonnych z zastosowaniem klasycznej techniki immunocytochemicznej ABC, ekspresja markerów nacyniowych (CD34, CD31, endogлина, ICAM-1, kolagen IV, laminina, VEGF) dotyczyła komórek śródbłonka i błon podstawnych *endothelium* naczyń krwionośnych o różnej średnicy i budowie histologicznej oraz komórek nacieków zapalnych (głównie VEGF) w dziąsłach pacjentów z CP. Taka lokalizacja markerów podlegała ocenie ilościowej z zastosowaniem techniki wizualizacji przestrzennej. Wszystkie markery błonowe występowały także (choć nie były dlań specyficzne) w komórkach wysokiego śródbłonka dziąsłowych HEV, obserwowanych u pacjentów z CP oraz w HEV odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2). Podobieństwo morfologiczne oraz zbliżona ilościowa ekspresja badanych markerów błonowych (z wyjątkiem PECAM-1) w HEV dziąsłowych i HEV węzłów chłonnych sugeruje podobieństwo funkcjonalne HEV w tkankach zmienionych zapalnie. Spośród wszystkich markerów największa ekspresja w obrębie dziąsłowych HEV dotyczyła w kolejności PECAM-1 (CD31), CD34 i lamininy. Istotnie większa ekspresja w dziąsłowych HEV w porównaniu do naczyń zwykłych dotyczyła: CD34, endogliny (CD105), ICAM-1 i kolagenu IV. Ekspresja cząsteczki CD34 w HEV, a PECAM-1 w naczyniach zwykłych dziąsła korelowała ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*) u pacjentów z CP.

Wydaje się, że grubszą błonę podstawną z ilościową większą ekspresją kolagenu IV, mają „prawdziwe” HEV odczynowych węzłów chłonnych w porównaniu z histologicznie podobnymi dziąsłowymi HEV, obserwowanymi w zapaleniu przyzębia. Natomiast dziąsłowe HEV cechowały się istotnie większą ekspresją kolagenu IV w porównaniu z typowymi naczyniami dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Nie udało się zaobserwować spodziewanej większej ekspresji białek błony podstawnej (kolagen IV i laminina) w naczyniach dziąsła z CP w porównaniu z naczyniami kontrolnych dziąseł (grupa K1).

Badania obecne wskazują na większą ekspresję VEGF w przypadku pacjentów z CP w porównaniu z grupami kontrolnymi (K1 i K2), co mogłoby potwierdzać potencjalny udział lokalnej produkcji VEGF w remodelowaniu naczyń krwionośnych dziąsła a być może także w powstawaniu naczyń HEV w przewlekłym zapaleniu narządu.

Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji żadnego z markerów naczyniowych w zależności od wartości parametru CAL, postaci choroby (zlokalizowana, uogólniona), wieku i płci pacjenta z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Potrzebne są dalsze badania do określenia czy zbadane w tej pracy potencjalne biomarkery naczyń, a zwłaszcza dziąsłowych HEV mogą służyć do identyfikacji miejsc zwiększonego ryzyka progresji choroby przyzębia i lepszej odpowiedzi na leczenie.

## VII. WNIOSKI

1. Profil powierzchniowych markerów wysokiego śródbłonka żyłek pozawłosowatych (HEV) i płaskiego śródbłonka typowych naczyń krwionośnych dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia obejmuje wszystkie badane markery naczyń (CD34, CD31, endoglinę i ICAM-1).
2. Istotnie większa ekspresja w naczyniach HEV w porównaniu ze zwykłymi naczyniami dziąsła oraz wysokie pozytywne wzajemne korelacje CD34, endogliny i ICAM-1 w dziąsłowych HEV mogą świadczyć o roli tych cząsteczek w adhezji i transporcie leukocytów przez ścianę HEV.
3. Podobieństwo morfologiczne oraz zbliżona ilościowa ekspresja 3/4 badanych markerów błonowych w HEV dziąsłowych i HEV węzłów chłonnych sugeruje podobieństwo funkcjonalne HEV niezależnie od tkankowej lokalizacji tych naczyń.
4. Ekspresja komórkowa badanych markerów naczyń krwionośnych dziąsła oraz VEGF w przewlekłym zapaleniu przyzębia zasadniczo (poza CD34 i CD31) nie zależy od lokalnej aktywności zapalnej (*grading*).
5. Zwiększony w stosunku do kontroli negatywnej (K1) indeks angiogenetyczny (endoglina/PECAM-1 oraz VEGF/PECAM-1) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia świadczy o wzmożonej angiogenezie w zapalnie zmienionych tkankach przyzębia.
6. Ekspresja antygenów naczyniowych HEV w przewlekłym zapaleniu przyzębia nie koreluje w istotny sposób z postacią choroby (zlokalizowana, uogólniona) oraz wartością klinicznego poziomu/utrąty przyczepu (CAL).

## VIII. STRESZCZENIE

Rozwój chorób przyzębia jest związany z rozplemem małych naczyń krwionośnych. Występują wyspecjalizowane formy żyłek pozawłosowatych z tzw. z wysokim śródbłonkiem (ang. *high endothelial venules*, HEV). Obecność HEV w przewlekłym zapaleniu przyzębia (ang. *chronic periodontitis*), przy nieobecności w zdrowym dziąśle nasuwa przypuszczenie, że pełnią one ważną rolę w patogenezie tej choroby u człowieka. Dowiedziono zwiększonej reaktywności komórek śródbłonka na czynniki infekcyjne, które aktywują migrację komórek odpowiedzi immunologicznej (głównie limfocytów T i B) poza ścianę naczynia.

We Wstępie pracy podano aktualną wiedzę na temat budowy cząsteczkowej i roli markerów naczyniowych (w tym HEV) w tzw. kaskadzie adhezyjnej z odniesieniem do chorób przyzębia, zwłaszcza CP.

Celem obecnej pracy była immunocytochemiczna charakterystyka markerów komórek wysokiego śródbłonka HEV występujących w dziąsłach pacjentów z CP z dokładniejszym określeniem roli tych naczyń w progresji przewlekłego zapalenia przyzębia. Cele szczegółowe pracy obejmowały: (1) analizę komórkowej ekspresji antygenów błonowych (CD34, CD31, CD105, ICAM-1), białek błony podstawnej komórek śródbłonka naczyń krwionośnych (kolagen IV, laminina) oraz naczynio-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia; (2) charakterystykę morfologiczną żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV) oraz ilościową ocenę ekspresji markerów komórek śródbłonka (HEC) w przewlekłym zapaleniu przyzębia; (3) próbę określenia korelacji pomiędzy tkankową ekspresją antygenów naczyń krwionośnych dziąsła pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (w tym HEV) a wybranymi danymi klinicznymi pacjentów.

Materiał tkankowy do badań pobierano w trakcie zabiegu kiretażu otwartego z gingiwektomią (ang. *flap operation*) i stanowiły go wycinki dziąseł 40 pacjentów dorosłych (23 kobiet i 17 mężczyzn; średnia wieku:  $43 \pm 11$  lat) z CP oraz fragmenty dziąseł od pacjentów bez klinicznych cech choroby przyzębia (grupa K1, n=15). Grupę kontrolną 2 (K2) (n=7) stanowiły fragmenty odczynowych węzłów chłonnych, z obecnością licznych HEV. Zabieg chirurgiczny w grupie CP został przeprowadzony po wykonaniu fazy higienizacyjnej leczenia periodontologicznego oraz uzyskaniu wskaźnika API < 15%. Od każdego pacjenta pobierano 1-4 fragmentów tkanek przyzębia z okolicy różnych zębów o różnych wartościach CAL (ang. *clinical attachment level*): CAL I - 0-3 mm, CAL II - 4-6

mm, CAL III -  $\geq 7$  mm. W przypadku pacjentów ze zlokalizowaną postacią choroby materiał pobierano z okolicy objętej zapaleniem, w postaci uogólnionej materiał pobierano z kilku okolic. Po utrwaleniu tkanek w zbuforowanej 4% formalinie oraz zatopieniu w parafinie, wykonano klasyczne barwienie hematoksyliną i eozyną dla oceny histologicznej. Nasilenie zmian zapalnych (*grading*) określano w 4-stopniowej skali półilościowej. Do badań immunocytochemicznych wykorzystano klasyczną technikę ABC (strept)awidyna biotynylowana peroksydaza) z użyciem przeciwciał monoklonalnych do wykrywania następujących antygenów: CD34, PECAM-1 (CD31), endogliny (CD105), ICAM-1 (CD54), kolagenu IV, lamininy i VEGF. Analizę morfometryczną prowadzono z zastosowaniem metody opartej na wizualizacji przestrzennej markerów zarejestrowanych na obrazach mikroskopowych z pozytywną reakcją immunocytochemiczną, opracowanej i wdrażanej do programu komputerowego A4D. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica PL v. 8.0. Jako zależność bądź różnicę statystycznie znaczącą przyjęto wyniki na poziomie istotności  $p \leq 0,05$ .

W dziąsłach pacjentów z CP obserwowano rozplem małych naczyń krwionośnych różnego typu (głównie włóscizki i żyłki). Cechą charakterystyczną było występowanie zróżnicowanej indywidualnie, ale powtarzalnej cechy – żyłek pozawłosowatych o wyglądzie naczyń typu HEV, obserwowanych w odczynowych węzłach chłonnych (grupa K2). Naczynia typu HEV rozmieszczone były bez wyraźnie określonej topografii, niekiedy już pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej. Z reguły naczynia te towarzyszyły bardziej nasilonym naciekom zapalnym, zbudowanym głównie z limfocytów. Pojedyncze HEV obserwowano jedynie u 2 pacjentów z grupy K1 (zdrowe przyzębie).

Ekspresję markerów błonowych (CD34, CD31, endoglina, ICAM-1) oraz błon podstawnych (kolagen IV, laminina) wykazano na komórkach *endothelium* naczyń krwionośnych o różnej średnicy i budowie histologicznej oraz komórek nacieków zapalnych (głównie VEGF) w dziąsłach pacjentów z CP. Wszystkie markery występowały także na komórkach wysokiego śródbłonka dziąsłowych HEV (grupa CP) oraz HEV odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2). Podobieństwo morfologiczne oraz zbliżona ilościowa ekspresja badanych markerów błonowych (z wyjątkiem PECAM-1) w HEV dziąsłowych i HEV węzłów chłonnych sugeruje podobieństwo funkcjonalne HEV w tkankach zmienionych zapalnie. Spośród wszystkich markerów największa ekspresja w obrębie dziąsłowych HEV dotyczyła w kolejności PECAM-1 (CD31), CD34 i lamininy. Istotnie większa ekspresja w dziąsłowych HEV w porównaniu do naczyń zwykłych dotyczyła: CD34, endogliny (CD105), ICAM-1 i

kolagenu IV. Ekspresja CD34 w HEV, a PECAM-1 w naczyniach zwykłych dziąsła korelowała ze wzrostem aktywności zapalnej (*grading*) u pacjentów z CP. Wydaje się, że grubszą błonę podstawną z ilościową większą ekspresją kolagenu IV, mają HEV odczynowych węzłów chłonnych w porównaniu z histologicznie podobnymi dziąsłowymi HEV, obserwowanymi w zapaleniu przyzębia. Natomiast dziąsłowe HEV cechowały się istotnie większą ekspresją kolagenu IV w porównaniu z typowymi naczyniami dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Nie było różnic w nasileniu ekspresji kolagenu IV i lamininy w grupie CP w porównaniu z naczyniami kontrolnych dziąseł (grupa K1). Badania obecne wykazały większą ekspresję VEGF u pacjentów z CP w porównaniu z grupami kontrolnymi (K1 i K2). Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji żadnego z markerów naczyniowych w zależności od wartości CAL, postaci choroby (zlokalizowana, uogólniona), wieku i płci pacjenta z przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Pracę podsumowano następującymi wnioskami: (1) Profil powierzchniowych markerów wysokiego śródbłonna żyłek pozawłosowatych (HEV) i płaskiego śródbłonna typowych naczyń krwionośnych dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia obejmuje wszystkie badane markery naczyń (CD34, CD31, endoglinę i ICAM-1); (2) Istotnie silniejsza ekspresja w naczyniach HEV w porównaniu ze zwykłymi naczyniami dziąsła oraz wysokie pozytywne wzajemne korelacje CD34, endogliny i ICAM-1 w dziąsłowych HEV mogą świadczyć o roli tych cząsteczek w adhezji i transporcie leukocytów przez ścianę HEV; (3) Podobieństwo morfologiczne oraz zbliżona ilościowa ekspresja 3/4 badanych markerów błonowych w HEV dziąsłowych i HEV węzłów chłonnych sugeruje podobieństwo funkcjonalne HEV niezależnie od tkankowej lokalizacji tych naczyń; (4) Ekspresja komórkowa badanych markerów naczyń krwionośnych dziąsła oraz VEGF w przewlekłym zapaleniu przyzębia zasadniczo (poza CD34 i CD31) nie zależy od lokalnej aktywności zapalnej (*grading*); (5) Zwiększony w stosunku do kontroli negatywnej (K1) indeks angiogenetyczny (endoglina/PECAM-1 oraz VEGF/PECAM-1) w dziąsłach pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia świadczy o wzmożonej angiogenezie w zapalnie zmienionych tkankach przyzębia; (6) Ekspresja antygenów naczyniowych HEV w przewlekłym zapaleniu przyzębia nie koreluje w istotny sposób z postacią choroby (zlokalizowana, uogólniona) oraz wartością klinicznego poziomu/utruty przyczepu (CAL).

## **IX. SUMMARY**

Development of periodontal diseases is linked to hypertrophy of small blood vessels. Specialized forms of high endothelial venules (HEV) are also present. Presence of HEV in chronic periodontitis (CP) and their absence in healthy gingiva suggests that they play an important role in pathogenesis of the human disease. An increased reactivity of endothelial cells to infectious agents has been proven, which activates extravasation of immune response cells (mainly lymphocytes T and B).

In the Introduction current knowledge has been summed up on molecular structure and role of vascular markers (including HEV) in the, so called, adhesion cascade in development of periodontal diseases and CP in particular.

This study aimed at immunocytochemical characterization of HEV markers present in gingiva of CP patients accompanied by a more precise definition of the blood vessel's role in progression of CP. Detailed aims of the study included: (1) analysis of membrane antigen cellular expression (CD34, CD31, CD105, ICAM-1), expression of basement membrane protein expression in blood vessel endothelium (collagen IV, laminin) and of vascular endothelium growth factor (VEGF) in gingiva of CP patients; (2) morphological characteristics of HEV and quantitative analysis of high endothelium cells (HEC) markers expression in CP; (3) determination of any correlation between tissue expression of antigens of blood vessels in gingiva of patients with CP (including HEV) on one hand and selected clinical data of the patients on the other.

Tissue material for the studies was sampled during open curetage with gingivectomy (flap operation) and included samples of gingiva obtained from 40 adult patients (23 women and 17 men, mean age of  $43 \pm 11$  years) with CP and fragments of gingiva obtained from patients with no clinical signs of periodontal diseases (group K1,  $n=15$ ). The other control group (K2) ( $n=7$ ) included fragments of reactive lymph nodes with presence of numerous HEV. In CP surgical procedure was conducted following hygienization stage of periodontal treatment conducted until API index  $<15\%$  was reached. From every patient 1-4 fragments of periodontal tissues were obtained from vicinity of teeth with various values of CAL (clinical attachment level): CAL I - 0-3 mm, CAL II - 4-6 mm, CAL III -  $\geq 7$  mm. In cases of patients with a localized form of the disease the material was sampled from the inflamed region, in the generalized form of the disease the material was sampled from several sites. Following fixation in 4% buffered formalin and embedding in paraffin classical staining with hematoxylin and eosin and histological evaluation were performed. Intensity of



inflammatory lesions (grading) was defined in the 4-grade semi-quantitative scale. Immunocytochemical studies took advantage of the classical ABC (streptavidin biotinylated peroxidase) technique using monoclonal antibodies to the following antigens: CD34, PECAM-1 (CD31), endoglin (CD105), ICAM-1 (CD54), collagen IV, laminin and VEGF. Morphometric analysis was performed using a technique based on spatial visualization of markers registered in microscopic images with positive immunocytochemical reaction, designed and implemented in A4D computer software. Statistical analysis took advantage of the Statistica PL v. 8.0 software. Differences at  $p \leq 0.05$  were regarded significant.

In gingiva of patients with CP proliferation of small blood vessels of various type was observed (mainly of capillaries and venules). The characteristic trait involved manifestation of individually variable but reproducible trait: post-capillary venules of HEV type, similar to observed in reactive lymph nodes (group K2). HEV type blood vessels were distributed with no specific topography, occasionally under epithelium of periodontal pocket. As a rule, the blood vessels accompanied more pronounced inflammatory infiltrates, consisting mainly of lymphocytes. Individual HEV were observed only in two patients of K1 group (healthy periodontium).

Expression of membrane antigens (CD34, CD31, endoglin, ICAM-1) and antigens of basement membranes (collagen IV, laminin) was demonstrated in endothelial cells in blood vessels of a variable diameter and histological structure and in cells of inflammatory infiltrates (mainly VEGF) in gingiva of CP patients. All the markers were present also on cells of a high endothelium in gingival HEV (group CP) and in HEV of reactive lymph nodes (group K2). Morphological similarity and quantitatively similar expression of studied membrane markers (except PECAM-1) in gingival HEV and HEV of the lymph nodes suggested functional similarity of HEV in tissues involved by inflammation. Among all the markers the most pronounced expression within gingival HEV was shown, in sequence, by PECAM-1 (CD31), CD34 and laminin. A significantly higher expression in gingival HEV, as compared to ordinary blood vessels, involved: CD34, endoglin (CD105), ICAM-1 and collagen IV. Expression of CD34 in HEV, and of PECAM-1 in ordinary blood vessels manifested correlation with grading in patients with CP. As compared to histologically similar gingival HEV, observed in CP, HEV of reactive lymph nodes seemed to manifest a thicker basement membrane with quantitatively greater expression of collagen IV. Gingival HEV, on the other hand, demonstrated a significantly higher expression of collagen IV, as compared to typical blood vessels in gingiva of patients with CP. No differences in intensity

of collagen IV and laminin expressions were noted between CP group and control gingiva (group K1). Present studies disclosed a more pronounced expression of VEGF in patients with CP as compared to control groups (K1 and K2). No significant differences were disclosed in expression of any vascular marker which would be dependent on value of CAL, form of the disease (local or generalized one), age or sex of the patient with CP.

The study was summed up with the following conclusions: (1) The profile of surface markers in high endothelium post-capillary venules (HEV) and flat endothelium of typical gingival blood vessels in patients with chronic periodontitis includes all the studied vascular markers (CD34, CD31, endoglin and ICAM-1); (2) A significantly more pronounced expression in HEV blood vessels as compared to ordinary gingival blood vessels and the highly positive reciprocal correlations of CD34, endoglin and ICAM-1 in gingival HEV may point to the role of the molecules in adhesion and transport of leukocytes across HEV wall; (3) Morphological similarity and quantitatively similar expression of 3/4 studied membrane markers in HEV of gingiva and HEV of lymph nodes points to functional similarity of HEV, independent on tissue localization of the blood vessels; (4) Cellular expression of the studied blood vessel markers of gingiva and VEGF in chronic periodontitis in principle (apart from CD34 and CD31) does not depend on the local inflammatory activity (grading); (5) The increased as compared to the negative control (K1) angiogenetic index (endoglin/PECAM-1 and VEGF/PECAM-1) in gingiva of patients with chronic periodontitis provides evidence for a stimulated angiogenesis in inflammatory altered periodontal tissues; (6) Expression of the HEV markers in chronic periodontitis does not correlate significantly with form of the disease (localized, generalized) and clinical attachment level/loss (CAL).

## X. PIŚMIENICTWO

1. Aimetti M, Romano F, Marsico A, Navone R. Non-surgical periodontal treatment of cyclosporin A-induced gingival overgrowth: immunohistochemical results. *Oral Dis* 2008; 14:244-250.
2. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCam/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991; 114:1059-1068.
3. Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG. Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology* 1976; 31:455-473.
4. Andrews P, Milsom DW, Ford WL. Migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium. V. Production of sulphated macromolecule by high endothelial cells in lymph node. *J Cell Sci* 1982, 57:277-292.
5. Antosz H. Antygen CD34 i komórki CD-34 pozytywne. *Post Biol Kom* 2004; 31:285-198.
6. Aspriello SD, Zizzi A, Lucarini G, Rubini C, Faloia E, Boscaro M, Tirabassi G, Piemontese M. Vascular endothelial growth factor and microvessel density in periodontitis patients with and without diabetes. *J Periodontol* 2009; 80:1783-1789.
7. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engvall E, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 2005, 24:326-332.
8. Aumailley M, Timpl R. Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *Cell Biol.* 1986, 103:1569-1575.
9. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johannes FE, Jahnes FL, Amalric F, Brandtzaeg P, Erard M, Haraldsen G, Girard JP. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 2003, 163:69-79.
10. Bałan BJ. Angiogeneza – problem na miarę XXI wieku. *Nowa Medycyna – Pulmunologia IV zeszyt 100 (4/200)*.
11. Barresi V, Grosso M, Vitarelli E, Granese R, Barresi G. Endoglin (CD105) immun-expression in human foetal and neonatal lungs. *Histol Histopathol* 2008; 23:701-708.
12. Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky LA. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994; 84:2554-2565.
13. Baumhueter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993, 262:436-438.
14. Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* 1990; 4:148-160.

15. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: A potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 1995; 372:83-87.
16. Benedetti F. CD34+ cells: biological aspects. *Tumori* 1996; 82 (2 Suppl):S3-S13.
17. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 1993; 366:695-698.
18. Bergström J. Vascular reaction in plaque-induced gingivitis: a quantitative approach. *J Periodontal Res* 1992; 27:604-608.
19. Bernabéu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* 2007; 102:1375-1388.
20. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, Letarte M, Vitetta ES, Thorpe PE. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumours: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1623-1634.
21. Bistrup A, Tsay D, Shenoy P, Singer MS, Bangia N, Luther SA, Cyster JG, Ruddle NH, Rosen SD. Detection of a sulfotransferase (HEC-GlcNAc6ST) in high endothelial venules of lymph nodes and in high endothelial venule-like vessels within ectopic lymphoid aggregates. Relationship to the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* 2004; 164:1635-1644.
22. Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med.* 1994; 179:1059-1064.
23. Bonakdar MP, Barber PM, Newman HN. The vasculature in chronic adult periodontitis: a qualitative and quantitative study. *J Periodontol* 1997; 68:50-58.
24. Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res* 1998; 33:491-499.
25. Buduneli N, Atilla G, Güner G, Oktay G. Biochemical analysis of total collagen content and collagen types I, III, IV, V and VI in gingiva of various periodontitis categories. *J Int Acad Periodontol* 2001; 3:1-6.
26. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisser HM. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1181-1190.
27. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004; 167:377-388.
28. Chapple CC, Kumar R, Hunter N. Vascular remodelling in chronic inflammatory periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:500-506.
29. Chavrier C, Couble ML. Immunohistochemical study of types I, III and IV collagen in disseminated human gingiva of patients with rapidly progressive periodontitis: a light and electron microscopic study. *Cell Mol Biol* 1989; 35:457-467.

30. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Barnabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:19027-19030.
31. Cindrić G, Aurer A, Plancak D, Ljerka J, Girotto M. Lymphocyte subpopulations and the expression of intercellular adhesion molecules in chronic periodontitis. *Coll Antropol* 2004; 28:825-832.
32. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271:736-741.
33. Cooke VG, Kalluri R. Molecular mechanism of type IV collagen-derived endogenous inhibitors of angiogenesis. *Methods Enzymol* 2008; 444: 1-19.
34. Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol* 2005; 77:487-495.
35. Cook-Mills JM, Gallagher JS, Feldbush TL. Isolation and characterization of high endothelial cell lines derived from mouse lymph nodes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32:167-177.
36. Crawford JM. Distribution of ICAM-1, LFA-3 and HLA-DR in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontal Res* 1992; 27:291-298.
37. Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1931-1937.
38. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF. CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 1993; 81:1001-1008.
39. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994; 15:490-495.
40. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151:671-677.
41. Duijvestijn AM, Horst E, Pals ST, Rouse BN, Steere AC, Picker LJ, Meijer CJ, Butcher EC. High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *Am J Pathol* 1988; 130:147-155.
42. Duijvestijn AM, Kerkhove M, Bargatze RF, Butcher EC. Lymphoid tissue- and inflammation-specific endothelial cell differentiation defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1987; 138: 713-719.

43. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, Kaufman SA, Yoshida H, Spellberg J, Luis de la Pompa J, Elia A, Wakeham A, Karan-Tamir B, Muller WA, Senaldi G, Zukowski MM, Mak TW. Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol* 1999; 162:3022-3030.
44. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001; 49:419-432.
45. Evensen L, Micklem DR, Blois A, Berge SV, Aarsaether N, Littlewood-Evans A, Wood J, Lorens JB. Mural cell associated VEGF is required for organotypic vessel formation. *PLoS One* 2009; 4:e5798.
46. Faveeuw C, Preece G, Ager A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001, 98:688-695.
47. Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34→qter. *Cytogenet Cell genet* 1993; 64:204-207.
48. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 14:2413-2422.
49. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55:15-35.
50. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptor (review). *Nat Med* 2003; 9:669-676.
51. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family proteins. *Endocr Rev* 1992; 13:18-32.
  
52. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995; 270:1500-1502.
53. Freemont AJ. A possible route for lymphocyte migration into diseased tissues. *J Clin Pathol* 1983; 36:161-166.
54. Freemont JA. Functional and biosynthetic changes in endothelial cells of vessels in chronically inflamed tissues: evidence for endothelial control of lymphocyte entry into diseased tissues. *J Pathol* 1988; 155:225-230.
55. Freemont AJ, Jones CJP. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of human lymph node paracortical venules. *J Anat* 1983; 136: 349-362.
56. Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 1997; 17:1193-1202.
57. Gemmell E, Feldner B, Seymour GJ. CD45RA and CD45RO positive CD4 cells in human peripheral blood and periodontal disease tissue before and after stimulation with periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:84-88.

58. Gemmell E, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *J Periodontal Res* 1994; 29:46-53.
59. Girard JP, Baekkevold ES, Yamanaka T, Haraldsen G, Brandtzaeg P, Amalric F. Heterogeneity of endothelial cells. The specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol* 1999; 155:2043-2055.
60. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995; 16:449-457.
61. Girard JP, Springer TA. Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules. *J Biol Chem* 1996; 271:4511-4517.
62. Goldberger A, Middleton KA, Oliver JA, Paddock C, Yan H, DeLisser HM, Albelda SM, Newman PJ. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *J Biol Chem* 1994; 269:17183-17191.
63. Gołąb J. Krążenie limfocytów. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red.). PWN, Warszawa 2008, s. 191-204.
64. Gorfou G, Virtanen I, Hukkanen M, Lehto VP, Rousselle P, Kenne E, Lindbom L, Kramer R, Tryggvason K, Patarroyo M. Laminin isoforms of lymph nodes and predominant role of alpha5-laminin(s) in adhesion and migration of blood lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2008; 84:701-712.
65. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 265:8361-8364.
66. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:258-263.
67. Haapasalmi K, Mäkelä M, Oksala O, Heino J, Yamada KM, Uitto VJ, Larjava H. Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic inflammation. *Am J Pathol* 1995; 147:193-206.
68. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM: Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005; 85:979-1000.
69. Hannigan E, O'Connell DPO, Hannigan A, Buckley LA. Soluble cell adhesion molecules in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2004; 75:546-550.
70. Hausmann M. Ocena apoptozy i tkankowej ekspresji wirusa Epsteina-Barr (EBV) w przewlekłych zapaleniach przyzębia. Rozprawa doktorska, Poznań 2007.
71. Hendriks HR, Eestermans IL. Disappearance and reappearance of high endothelial venules and immigrating lymphocytes in lymph nodes deprived of afferent lymphatic vessels: a

- possible regulatory role of macrophages in lymphocyte migration. *Eur J Immunol* 1983; 13:663-669.
72. Hess KL, Tudor KS, Johnson JD, Osati-Ashtiani F, Askew DS, Cook-Mills JM. Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Exp Cell Res* 1997; 236:404-411.
  73. Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Tsuboi S, Suzuki M, Yeh JC, Izawa D, Tanaka T, Miyasaka M, Lowe JB, Fukuda M. A novel, high endothelial venule specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity* 1999; 11:79-79.
  74. Hock JM, Kim S. Blood flow in healed and inflamed periodontal tissues of dogs. *J Periodontal Res* 1987; 22:1-5.
  75. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of a avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-580.
  76. Ihan Hren N, Gubina M, Kozelj V, Ihan A. Immune response in chronic periapical parodontitis. *Pflugers Arch* 2000; 440:R86-R88.
  77. Izawa D, Tanaka T, Saito K, Ogihara H, Usui T, Kawamoto S, Matsubara K, Okubo K, Miyasaka M. Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *Int Immunol* 1999; 11:1989-1997.
  78. Jalkanen S, Steere AC, Fox I, Butcher EC. A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 1986; 233:556-558.
  79. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferris N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992; 89:244-253.
  80. Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factors and progression of periodontal diseases. *J Periodontol* 1999; 70:848-852.
  81. Joris I, Cuenoud HF, Underwood JM, Majno G. Capillary remodeling in acute inflammation: a form of angiogenesis. *FASEB J* 1992; 6:A938.
  82. Kabel PJ, Voorbij HA, de Haan-Meulman M, Pals ST, Drexhage HA. High endothelial venules present in lymphoid cell accumulations in thyroids affected by autoimmune disease: a study in men and BB rats of functional activity and development. *J Clin Endocrinol Metabolism* 1989; 68:744-751.
  83. Kaczmarek E, Strzelczyk R. From two to three-dimensional visualisation of structures in light and confocal microscopy – applications for biomedical studies. In: *Current issues on multidisciplinary microscopy research and education*. FORMATEX microscopy book series no. Eds.: Mendez-Vilas A, Labajos-Broncano L, II Formatex Research Centre, Badajoz 2005, 1<sup>st</sup> ed., 289-295.



84. Kaldjian EP, Gretz JE, Anderson AO, Shi Y, Shaw S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int Immunol* 2001; 13:1243-1253.
85. Kanda H, Tanaka T, Matsumoto M, Umemoto E, Ebisuno Y, Kinoshita M, Noda M, Kannagi R, Hirata T, Murai T, Fukuda M, Miyasaka M. Endomucin, a sialomucin expressed in high endothelial venules, supports L-selectin-mediated rolling. *Int Immunol* 2004; 16:1265-1274.
86. Kashiwazaki M, Tanaka T, Kanda H, Ebisuno Y, Izawa D, Fukuma N, Akimitsu N, Sekimizu K, Monden M, Miyasaka M. A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions. *Int Immunol* 2003; 15:1219-1227.
87. Kasprzak A, Hausmann M, Małkowska A, Biczysko-Murawa A, Stopa J. Analiza zmian histopatologicznych dziąsła u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia. *Dental Forum* 2006; 2:9-18.
88. Kasprzak A, Małkowska A, Hausmann M, Przybyszewska W, Zabel M, Stopa J. Detection of cell phenotypes and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) in chronic periodontitis using ImmunoMax technique. *Pol J Environ Stud* 2007; 16:328-336.
89. Kawashima H. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol Pharm Bull* 2006; 29:2343-2349.
90. Kefalides NA. A collagen of unusual composition and a glycoprotein isolated from canine glomerular basement membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 22:26-32.
91. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson B.G. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 2008; 71:357-370.
92. Kindlova M. Vascular supply of the periodontium in periodontitis. *Int Dent J* 1967; 17:476-489.
93. Kikuta A, Rosen SD. Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates. *Blood* 1994; 84: 3766-3375.
94. Kmieć Z. *Histologia i cytofizjologia zęba i jamy ustnej*. Wyd. I, Elsevier Urban&Partner, 2007, 1-148.
95. Kokkonen TS, Augustin MT, Mäkinen JM, Kekkonen J, Karttunen TJ. High endothelial venules of the lymph nodes express Fas ligand. *J Histochem* 2004; 52:693-699.
96. Koo TH, Jun HO, Bae SK, Kim SR, Moon CP, Jeong SK, Kim WS, Kim GC, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. *Porphyromonas gingivalis*, periodontal pathogen, lipopolysaccharide induces angiogenesis via extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human vascular endothelial cells. *Arch Pharm Res* 2007; 30:34-42.

97. Kopeć-Szlezak J. Znaczenie funkcjonalne molekuł CD (Cluster of Differentiation) komórek układu białokrwinkowego. *Onkol Pol* 2006; 9:81-86.
98. Kozar-Kamińska K, Kamiński R. Aktywacja limfocytów. W: *Immunologia*. Gołąb J, Jakóbiński M, Lasek W, Stokłosa T (red.). PWN, Warszawa 2008, s. 223-240.
99. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 1984; 99:692-698.
100. Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 1994; 84:691-701.
101. Kume T. Specification of arterial, venous, and lymphatic endothelial cells during embryonic development. *Histol Histopathol* 2010; 25:637-646.
102. Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F, Girard JP. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood* 2004; 103:4164-4172.
103. Lasky LA., Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel C, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992; 69:927-938.
104. Liao S, Ruddle NH. Synchrony of high endothelial venules and lymphatic vessels revealed by immunization. *Immunol* 2006; 177:3369-3379.
105. Ma B, Jablonska J, Lindenmaier W, Dittmar KE. Immunohistochemical study of the reticular and vascular network of mouse lymph node using vibratome sections. *Acta Histochem* 2007; 109:15-28.
106. Majno G. Chronic inflammation links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol* 1998; 153:1035-1039.
107. Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PI, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB. The  $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. *Cell* 1996; 86:613-653.
108. Małkowska Agata. Ekspresja wybranych cytokin prozapalnych (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) w chorobach przyzębia. Rozprawa doktorska. Poznań 2006.
109. Maragoudakis ME, Sarmonika M, Panoutsacopoulou M. Inhibition of basement membrane biosynthesis prevents angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244:729-733.
110. Mebius RE, Brevé J, Duijvestijn AM, Kraal G. The function of high endothelial venules in mouse lymph nodes stimulated by oxazolone. *Immunology* 1990; 71:423-427.

111. Michel CC, Neal CR. Openings through endothelial cells associated with increased microvascular permeability. *Microcirculation* 1999; 6:45-54.
112. Miossec P, Cavender D, Ziff M. Production of Interleukin 1 by human endothelial cells. *J Immunol* 1986; 136:2486-2491.
113. Mirbod SM, Ahing SI, Pruthi VK. Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumference in smokers and non-smokers. *J Periodontol* 2001; 72:1318-1323.
114. Mokrosiński J, Krajewska WM. Receptory pomocnicze w sygnalizacji TGF $\beta$ . *Post Biochem* 2008; 54:264-273.
115. Molè N, Kennel-de March A, Martin G, Miller N, Bènè MC, Faure GC. High levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in crevicular fluid of periodontitis patients with plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:754-758.
116. Moscow BS, Polson AM. Histological studies on the extension of the inflammatory infiltrate in human periodontitis. *J Clin Periodontol* 1991; 18:534-542.
117. Muller WA. The use of anti-PECAM reagents in the control of inflammation. *Agents Actions Suppl.* 1995; 46:147-157.
118. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993; 178:449-460.
119. Müller E, Stempfel S. A three-dimensional reconstruction of high endothelial venules in the mouse lymph node: an enzyme-histochemical study. *Anat Rec* 1985; 212:394-395, 424-429.
120. Murphy-Ullrich JE, Hook M. Trombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol* 1989; 109:1309-1319.
121. Nagakubo D, Murai T, Tanaka T, Usui T, Matsumoto M, Sekiguchi K, Miyasaka M. A high endothelial venule secretory protein, Mac25/Angiomodulin, interacts with multiple high endothelial venule-associated molecules including chemokines. *J Immunol* 2003; 171:553-561.
122. Nagashima M, Yoshiro S, Ishiwata T, Asano G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22:1624-1630.
123. Nagayoshi T, Mattei MG, Passage E, Knowlton R, Chu ML, Uitto J. Human laminin A chain (LAMA) gene: chromosomal mapping to locus 18p11.3. *Genomics* 1989; 5:932-935.
124. Nedbal W, Tomakidi P, Lehmann MJ, Dörfer C, Kohl A, Sczakiel G. Antisense-mediated inhibition of ICAM-1 expression: a therapeutic strategy against inflammation of human periodontal tissue. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12:71-78.
125. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997; 99:3-8.

126. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990; 247:1219-1222.
127. Newman PJ, Hillery CA, Albrecht R, Parise LV, Berndt MC, Mazurov AV, Dunlop LC, Zhang J, Rittenhouse SE. Activation-dependent changes in human platelet PECAM-I: phosphorylation, cytoskeletal association, and surface membrane redistribution. *J Cell Biol* 1992; 119: 239-246.
128. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:953-964.
129. Nicosia RF. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 1998; 153:11-16.
130. Nisengard RJ, Beutner EH. Immunologic studies of periodontal disease. V. IgG type antibodies and skin test responses to Actinomyces and mixed oral flora. *J Periodontol* 1970, 41:149-152.
131. Nissen NN, POverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RLK, Dipietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152:1445-1452.
132. O'Brien CD, Ji G, Wang YX, Sun J, Krymskaya VP, Ruberg FL, Kotlikoff MI, Albelda SM. PECAM-1 (CD31) engagement activates a phosphoinositide-independent, nonspecific cation channel in endothelial cells. *FASEB J* 2001; 15:1257-1260.
133. Ohta S, Yamada S, Matuzaka K, Inoue T. The behavior of stem cells and progenitor cells in the periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical methods. *J Periodontal Res* 2008; 43:595-603.
134. Oostingh GJ, Ludwig RJ, Enders S, Gruner S, Harms G, Boehncke H, Nieswandt B, Tauber R, Schön MP. Diminished lymphocyte adhesion and alleviation of allergic responses by small-molecule – or antibody-mediated inhibition of L-Selectin functions. *J Invest Dermatol* 2007; 127:90-97.
135. Orima K, Yamazaki K, Aoyagi T, Hara K. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:153-160.
136. Pablos JL, Santiago B, Tsay D, Singer MS., Palao G, Galindo M, Rosen SD. A HEV-restricted sulfotransferase is expressed in rheumatoid arthritis synovium and is induced by lymphotoxin- $\alpha/\beta$  and TNF- $\alpha$  in cultured endothelial cells. *BMC Immunol* 2005; 7:1-6.

137. Palmeri D, Zuo FR, Rosen SD, Hemmerich S. Differential gene expression profile of human tonsil high endothelial cells: implications for lymphocyte trafficking. *J Leukoc Biol* 2004; 75:910-927.
138. Page RC, Beck JD. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J* 1997; 47:61-87.
139. Page RC, Simpson DM, Ammons WF. Host tissue response in chronic inflammatory periodontal disease IV. The periodontal and dental status of a group of aged great apes. *J Periodontol* 1975; 46:144-155.
140. Pammer J, Weninger W, Mildner M, Burian M, Wojta J, Tschachler E. Vascular endothelial growth factor is constitutively expressed in normal human salivary gland and is secreted in the saliva of healthy individuals. *J Pathol* 1998; 186:186-191.
141. Paprocka M, Duś D. Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonnów naczyń. *Post Biol Kom* 2000; 27:247-260.
142. Park HJ, Jeong SK, Kim SR, Bae SK, Kim WS, Jin SD, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. Resveratrol inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-kappaB activation. *Arch Pharm Res* 2009; 32:583-591.
143. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4:1317-1326.
144. Peng TK, Nisengard RJ, Levine MJ. The alteration in gingival basement membrane antigens in chronic periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57:20-24.
145. Pietruczuk M, Pietruczuk A, Pancewicz S, Hermanowska-Szpakowicz T. ICAM-1: budowa, rola biologiczna i znaczenie w praktyce klinicznej. *Pol Merkur Lek* 2004; 17:507-511.
146. Pinchback JS, Taylor BA, Gibbins JR, Hunter N. Microvascular angiopathy in advanced periodontal disease. *J Pathol* 1996, 179:204-209.
147. Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995, 6:230-247.
148. Prapulla DV, Sujatha PB, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2007; 78:1783-1787.
149. Puri KD, Finger EB, Gandernack G, Springer TA. Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules. *J Cell Biol* 1995; 131:261-270.
150. Rezavandi K, Palmer RM, Odell EW, Scott DA, Wilson RF. Expression of ICAM-1 and E-selectin in gingival tissues of smokers and non-smokers with periodontitis. *J Oral Pathol Med* 2002; 1:59-64.

151. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:129-156.
152. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991; 147:3788-3793.
153. Salmi M, Kalimo K, Jalkanen S. Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J Exp Med* 1993; 178:2255-2260.
154. Samulowitz U, Kuhn A, Brachtendorf G, Nawroth R, Braun A, Bankfalvi A, Böcker W, Vestweber D. Human endomucin. Distribution pattern, expression on high endothelial venules, and decoration with the MECA-79 epitope. *Am J Pathol* 2002; 160:1669-1681.
155. Sasseti C, Tangenmann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD. Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med* 1998; 187:1965-1975.
156. Segal GM, McCal E, Stueve T, Bagby GC Jr. Interleukin 1 stimulates endothelial cells to release multilineage human colony-stimulating activity. *J Immunol* 1987; 138:1772-1778.
157. Seymour GJ, Gemmel E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodont Res* 1993; 28:478-486.
158. Seymour GJ, Gemmel E, Walsh LJ, Powell RN. Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin Exp Immunol* 1988; 71:132-137.
159. Sheibani N, Frazier WA. Down-regulation of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 results in thrombospondin-1 expression and concerted regulation of endothelial cell phenotype. *Mol Biol Cell* 1998; 9:701-713.
160. Simmonds DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 1992; 148:267-271.
161. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontitis axis. *J Periodontal Res* 2003; 38:318-323.
162. Steffensen B, Duong AH, Milam SB, Potempa CL, Winborn WB, Magnuson VL, Chen D, Zardeneta G, Klebe RJ. Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 1992; 63:584-592.
163. Sun QH, DeLisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, Newman PJ. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem* 1996; 271:11090-11098.
164. Sunami-Kataoka Y, Akagi H, Nishizaki K, Taguchi T, Murakami T, Ohtsuka A. Chondroitin sulfate proteoglycan at the basal lamina beneath high endothelial cells in human palatine tonsils: a light and electron microscopic study using cationic colloidal iron method. *Arch Histol Cytol* 2001; 64:535-543.

165. Suthin K, Matsushita K, Machigashita M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, Izumi Y. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2003; 38:90-96.
166. Syrjanen KJ. Post-capillary venules of the mouse lymphatic tissues with special reference to the distribution of their endothelial IgG. *Exp Pathol* 1979; 17:134-142.
167. Szczepański M, Szynaka B, Dzieciotł J, Małdyk J. Ultrastruktura śródbłonna naczyń włosowatych migdałka gardłowego. *Alergia Astma Immunologia* 2001; 6:143-147.
168. Tachezy M, Reichelt U, Melenberg T, Gebauer F, Izbicki JR, Kaifi JT. Angiogenesis index CD105 (Endoglin)/CD31 (PECAM-1) as a predictive factor for invasion and proliferation in intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Histol Histopathol* 2010; 25:1239-1246.
169. Tada H, Sugawara S, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, Travis J, Shimauchi H, Takada H. Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. *J Dent Res* 2003; 82:796-801.
170. Taichman NS, Cruchley AT, Fletcher LM, Hagi-Pavli EP, Paleolog EM, Abrams WR, Booth V, Edwards RM, Malamud D. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab Invest* 1998; 78:869-875.
171. Takeuchi Y, Sakurai K, Ike I, Yoshie H, Kawasaki K, Hara K. ICAM-1-expressing pocket epithelium, LFA-1-expressing T cells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1995; 30:426-435.
172. Tamai R, Asai Y, Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2005; 73:6290-6298.
173. Tanaka Y, Albelda SM, Horgan KJ, van Seventer GA, Shimizu Y, Newman W, Hallam J, Newman PJ, Buck CA, Shaw S. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *J Exp Med* 1992; 176:245-253.
174. Tancharoen S, Matsuyama T, Abeyama K, Matsushita K, Kawahara K, Sangalungkarn V, Tokuda M, Hashiguchi T, Maruyama I, Izumi Y. The role of water channel aquaporin 3 in the mechanism of TNF-alpha-mediated proinflammatory events: implication in periodontal inflammation. *J Cell Physiol* 2008; 217:338-349.
175. Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, Shi L, Gao X, Diglio CA, Honn KV. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J Biol Chem* 1993; 268:22883-22894.

176. Tangemann K, Bisrup A, Hemmerich S, Rosen SD. Sulfation of high endothelial venule-expressed ligand for L-Selectin: effects on tethering and rolling of lymphocytes. *J Exp Med* 1999; 190:935-941.
177. Tanjore H, Kalluri R. The role of type IV collagen and basement membranes in cancer progression and metastasis. *Am J Pathol* 2006; 168:856-865.
178. Taşman F, Dağdeviren A, Kendir B, Özçelik B, Ataç A, Er N. Endothelial cell adhesion molecules in human dental pulp: a comparative immunohistochemical study on chronic periodontitis. *J Endod* 1999; 25:664-667.
179. Thurston G, Baluk P, McDonald DM. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation* 2000; 7:76-80.
180. Tohya K, Umemoto E, Miyasaka M. Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes. *Histol Histopathol* 2010; 25:781-794.
181. Tomczak M, Surdacka A, Kasprzak A. Żyłki pozawłosowate z wysokim śródbłonkiem (HEV) a przewlekłe zapalenie przyzębia. *Dental Forum* 2008, 1, XXXVI, 49-60.
182. Tonetti MS, Gerber L, Lang NP. Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinically healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *J Periodontal Res* 1994; 29:386-392.
183. Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis D, Arthur HM. Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res* 2002; 51:464-470.
184. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of „nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* 2002; 99:1030-1037.
185. Turley H, Scott PAE, Watts VM, Bicknell R, Harris AL, Gatter KC. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. *J Pathol* 1998; 186:313-318.
186. Umemoto E, Tanaka T, Kanda H, Jin S, Tohya K, Otani K, Matsutani T, Matsumoto M, Ebisuno Y, Jang MH, Fukuda M, Hirata T, Miyasaka M. Nepmucin, a novel sialomucin, mediates L-selectin-dependent lymphocyte rolling and promotes lymphocyte adhesion under flow. *J Exp Med* 2006; 203:1603-1614.
187. Umezawa K, Ikebe J, Nomizu M, Nakamura H, Higo J. Conformational requirement on peptides to exert laminin's activities and search for protein segments with the laminin's activities. *Biopolymers* 2009; 92:124-131.
188. Unlü F, Güneri PG, Hekimgil M, Yesilbek B, Boyacioğlu H. Expression of vascular endothelial growth factor in human periodontal tissues: comparison of healthy and diabetic patients. *J Periodontol* 2003; 74:181-187.
189. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 1996; 74:13-33.



190. van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F, Mummery CL. Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 2006; 114: 2288-2297.
191. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993; 262:1580-1582.
192. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:211-220.
193. von Andrian UH, M'Rini C. In situ analysis of lymphocyte migration to lymph nodes. *Cell Adhes Commun* 1998; 6:85-96.
194. Vracko R., Benditt EP. Capillary basal lamina thickening. Its relationship to endothelial cell death and replacement. *J Cell Biol* 1970; 47:281-285.
195. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen J.B, Skaleric U, Mangan FF. Role of Transforming Growth Factor Beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol* 1993; 64:450-455.
196. Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 2000; 191:77-88.
197. Wierzbicka M (red.): *Periodontologia kliniczna*. Wyd. Sanmedia - Med Tour Press International 1992, wyd. I, cz. I.
198. Wierzbicka M, Biczysko W. Patogeneza zapaleń przyzębia w świetle najnowszych badań. *Czas Stomat* 1979; 32:721-724.
199. Wnuczko K, Szczepański M. Śródbłonek – charakterystyka i funkcje. *Pol Merk Lek* 2007, XXIII, 133:60-65.
200. Wolf HF, Edith M, Reteitschak KH. *Periodontologia*. Jańczuk Z (red. nauk. wyd. polskiego), Wyd. Czelej, Lublin 2006, s. 39-65; s. 165-177.
201. Woodruff JJ, Katz IM, Lucas LE, Stamper HB. An in vitro model of lymphocyte homing II. Membrane and cytoplasmic events involved in lymphocyte adherence to specialized high – endothelial venules of lymph nodes. *J Immunol* 1977; 119:1603-1610.
202. Wróbel T, Dzięgiel P, Mazur G, Zabel M, Kuliczkowski K, Szuba A. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology* 2005; 38:107-110.
203. Wynne SE, Walsh LJ, Seymour GJ. Specialized postcapillary venules in human gingival tissue. *J Periodontol* 1988; 59:328-331.
204. Xie Y, Muller WA. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Cell Biol* 1993; 90:5569-5573.

205. Yamazaki K, Nakajima T, Aoyagi T, Hara K. Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J Periodontal Res* 1993; 28:324-334.
206. Yan H, Scott Baldwin S, Sun J, Buck CA, Albelda SM, DeLisser HM. Alternative splicing of a specific cytoplasmic exon alters the binding characteristics of murine Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1). *J Biol Chem* 1995; 270:23672-23680.
207. Yan P, Yue J, Jiang H. Expression of ICAM-1/LFA-1 in the pocket area of adult periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1999; 43:106-108.
208. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998; 93:661-664.
209. Yang BG, Tanaka T, Jang MH, Bai Z, Hayasaka H. Binding of lymphoid chemokines to collagen IV that accumulates in the basal lamina of high endothelial venules: its implications in lymphocyte trafficking. *J Immunol* 2007; 197:4376-4382.
210. Yun P, Decarlo A, Chapple C, Hunter N. Functional implication of the hydrolysis of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (CD31) by gingipains of *Porphyromonas gingivalis* for the pathology of periodontal disease. *Inf Immun* 2005; 73:1386-1398.
211. Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H. Laminin forms and independent network in basement membranes. *J Cell Biol* 1992; 117:1119-1133.
212. Zhang D, Zheng H, Zhao J, Lin L, Li C, Liu J, Pan Y. *Porphyromonas gingivalis* induces intracellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells through the nuclear factor-kappaB pathway, but not through the p38 MAPK pathway. *J Periodontal Res* 2010, Sep 3 [Epub ahead of print].
213. Zhang X, Vuolteenaho R, Tryggvason K. Structure of the human laminin  $\alpha 2$ -chain gene (*LAMA2*), which is affected in congenital muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1996; 271:27664-27669.
214. Ziętek M. Schorzenia przyzębia jako przyczyny chorób ogólnoustrojowych. *Przew Lek* 2009; 1:235-237.
215. Zocchi MR, Poggi A. PECAM-1, apoptosis and CD34+ precursors. *Leuk Lymphoma* 2004; 45:2205-2213.
216. Zoellner H, Chapple CC, Hunter N. Microvasculature in gingivitis and chronic periodontitis: disruption of vascular networks with protracted inflammation. *Microsc Res Tech* 2002; 56:15-31.
217. Zoellner H, Hunter N. Perivascular hyaline deposits in inflamed gingival tissues. *J Oral Pathol Med* 1989; 18:333-338.

218. Zoellner H, Hunter N. High endothelial-like venules in chronically inflamed periodontal tissues exchange polymorphs. *J Pathol* 1989; 159:301-310.
219. Zoellner HF, Hunter N. Vascular expansion in chronic periodontitis. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:433-437.
220. Zoellner H, Hunter N. The vascular response in chronic periodontitis. *Aust Dent J* 1994; 39:93-97.

## **XI. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA**

**Fot. 1.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła u **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia:** (A) obecność pętli naczyniowych pod nabłonkiem wielowarstwowym płaskim; widoczne komórki płaskiego śródbłonka oraz erytrocyty w świetle naczyń lub poza nimi; (B) większy fragment blaszki właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) z żyłą wysłaną komórkami płaskiego śródbłonka; (C) obecność dwóch żyłek pozawłosowatych z wysokim śródbłonkiem (HEV), otoczonych licznymi komórkami obfitego nacieku zapalnego; (D) żyłka pozawłosowata z wysokim śródbłonkiem, z licznymi erytrocytami oraz leukocytami (głównie neutrofilami) w świetle naczynia; zwraca uwagę obecność jąder komórkowych endothelium o sześciennym kształcie, z obecnością przeważnie jednego jąderka (strzałka); (E-F) duże powiększenie fragmentu ściany HEV z widocznymi jądrami komórkowymi o sześciennym kształcie, zazwyczaj jednym jąderkiem; zwraca uwagę obecność erytrocytów oraz licznych leukocytów w świetle naczynia (G), bądź migrujących poprzez ścianę HEV (E).

Barwienie H+E. Powiększenie obiektywu 40x (A-D); 100x (E, F, G).

**Fot. 2.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła u **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (grupa kontrolna 1, K1): (A, B)** obecność nielicznych, drobnych, typowych (zwykłych) naczyń krwionośnych dziąsła obecnych pod nabłonkiem wielowarstwowym płaskim oraz w głębiej położonych obszarach *lamina propria*; widoczne erytrocyty w świetle naczyń lub poza nimi; **(B)** większe powiększenie fragmentu podnabłonkowego dziąsła z naczyniami włosowatymi wypełnionymi erytrocytami.

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych pacjentów z grupy kontrolnej 2 (K2): (C)** obecność żyłki pozawłosowatej z wysokim śródbłonkiem (HEV), otoczonej licznymi jednojądrzastymi komórkami w zmienionym zrębie węzła chłonnego; **(D)** żyłka pozawłosowata z wysokim śródbłonkiem, z licznymi leukocytami (głównie limfocytami, ale również neutrofilami) w świetle naczynia; zwraca uwagę obecność jąder komórek *endothelium* o sześciennym kształcie, z obecnością przeważnie jednego jąderka.

Barwienie H+E. Powiększenie obiektywu 10x (A); 40x (B-D).

**Fot. 3.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **cząsteczki CD34** w naczyniach typowych dziąsła (**A-C**) oraz w naczyniach HEV (**D-F**): (**A**) wyraźna pozytywna reakcja we wszystkich naczyniach krwionośnych dziąsła; zwraca uwagę rozplem naczyń krwionośnych zwykłych o różnej średnicy w zapalnie zmienionej tkance; (**B**) silna ekspresja CD34 w części błony komórkowej zwróconej do światła naczynia większości komórek *endothelium* typowych naczyń krwionośnych dziąsła w *lamina propria*; (**C**) silna pozytywna reakcja immunocytochemiczna na CD34 w komórkach płaskiego *endothelium* typowych naczyń krwionośnych dziąsła obecnych w otoczeniu komórek nabłonka kieszonki przyzębnej; (**D**) przykładowa HEV dziąsła z pozytywną reakcją na CD34. Silniejszy odczyn immunocytochemiczny w części luminalnej błony komórkowej; (**E**) żyłka pozawłosowata z wysokim śródbłonkiem i wyraźną reakcją błonową tego antygenu, zwraca uwagę także obecność licznych leukocytów w świetle HEV; (**F**) fragment tej samej HEV pod większym powiększeniem; wśród komórek w świetle naczynia obecne są granulocyty obojętnochłonne oraz limfocyty.

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: (**G**) pozytywna reakcja na CD34 w naczyniach zwykłych dziąsła; (**H**) CD34-immunopoztywne komórki wysokiego śródbłonka w nielicznych HEV dziąsła pacjenta z grupy kontrolnej.

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: (**I**) dość intensywne błonowe reakcje na CD34 w komórkach *endothelium* HEV.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 10x (A); 20x (G); 40x (B-E, H, I); 100x (F).

**Fot. 4.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **cząsteczki PECAM-1 (CD31)** w typowych naczyniach dziąsła (**A-B**) oraz w naczyniach HEV (**C, D**): (**A**) pozytywna reakcja błonowa CD31 w naczyniach krwionośnych dziąsła pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej; (**B**) ekspresja CD31 o różnym nasileniu, głównie w części błony komórkowej *endothelium* zwróconej do światła żyłek dziąsła w *lamina propria*; (**C**) silna pozytywna reakcja immunocytochemiczna na CD31 głównie w bocznych powierzchniach błony (strzałki) komórek wysokiego *endothelium* HEV dziąsła, widoczne także pojedyncze komórki nacieków zapalnych z pozytywną ekspresją PECAM-1; (**D**) przykładowa HEV dziąsła z pozytywną reakcją na CD31 zlokalizowana tuż pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej.

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: (**E**) pozytywna reakcja na CD31 w naczyniach zwykłych dziąsła obecnych pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej.

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: (**F**) błonowa reakcja na CD31 o słabym nasileniu (**F**) oraz o większym nasileniu (**G**) w komórkach *endothelium* HEV. Zwraca uwagę typowa lokalizacja (luminalna) cząsteczki CD31. Obecność pozytywnej reakcji immunocytochemicznej także w pojedynczych komórkach jednojądrzastych miąższu węzła chłonnego (**G**).

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-G).



**Fot. 5.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **endogliny (CD105)** w typowych naczyniach dziąsła **(A)** oraz w naczyniach HEV **(B, C, D)**: **(A)** pozytywna reakcja błonowo-cytoplazmatyczna na CD105 w zwykłych naczyniach krwionośnych dziąsła pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej; **(B)** silna ekspresja endogliny, głównie w części błony komórkowej *endothelium* zwróconej do światła żyłek HEV dziąsła w *lamina propria*; **(C)** silna pozytywna reakcja immunocytochemiczna na CD105 w części luminalnej HEV dziąsła oraz w cytoplazmie komórek *endothelium*; **(E)** HEV dziąsła z pozytywną reakcją na CD105 o lokalizacji błonowo-cytoplazmatycznej.

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: **(E)** pozytywna reakcja na endoglinę w naczyniach zwykłych dziąsła; zwraca uwagę miejscami słabe nasilenie reakcji immunocytochemicznej lub nieobecność odczynu w części komórek śródbłonka **(F)**.

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: **(G, H)** błonowa reakcja na CD105 o intensywnym nasileniu w komórkach *endothelium* HEV.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-H).

**Fot. 6.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **cząsteczki ICAM-1 (CD54)** w typowych naczyniach dziąsła (**A**) oraz w naczyniach HEV (**B, C**): (**A**) słaba pozytywna reakcja błonowa na ICAM-1 w zwykłych naczyniach krwionośnych dziąsła obecnych w *lamina propria* pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej; (**B**) silna ekspresja ICAM-1, głównie w części luminalnej błony komórkowej *endothelium* żyłek pozawłosowatych HEV dziąsła; (**C**) wyraźna pozytywna reakcja immunocytochemiczna na ICAM-1 w części luminalnej i bocznych powierzchniach błony komórek śródbłonka HEV dziąsła; obecność pozytywnej reakcji na cząsteczkę CD54 także w pojedynczych komórkach nacieków zapalnych w *lamina propria*.  
Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: (**D**) pozytywna reakcja na ICAM-1 w naczyniach zwykłych dziąsła; zwraca uwagę błonowa ekspresja CD54 w komórkach płaskiego śródbłonka małych naczyń krwionośnych (**F**).  
Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: (**E, F**) błonowa reakcja immunocytochemiczna na CD54 o słabym nasileniu w komórkach *endothelium* HEV.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-F).

**Fot. 7.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **kolagenu typu IV** w typowych naczyniach dziąsła (**A**) oraz w naczyniach HEV (**B, C, D**): (**A**) bardzo słaba pozytywna reakcja na kolagen typu IV w błonach podstawnych śródbłonka zwykłych naczyń krwionośnych dziąsła obecnych pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej; (**B**) silna ekspresja kolagenu IV w części przypodstawnej HEV zlokalizowanej pod nabłonkiem kieszonki przyzębnej; widoczna reakcja immunocytochemiczna także w błonie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego kieszonki przyzębnej (strzałka); (**C**) intensywne pozytywna reakcja immunocytochemiczna na kolagen typu IV w błonach podstawnych komórek wysokiego śródbłonka HEV dziąsła; bardzo nieliczne struktury włóknkowe z pozytywną reakcją na to białko rozproszone w tkance łącznej *lamina propria* dziąsła; (**D**) zróżnicowana reakcja na kolagen typu IV w ścianie tego samego HEV dziąsła pacjenta z CP.

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: (**E**) zwraca uwagę generalnie słaba ekspresja kolagenu IV w błonach podstawnych komórek płaskiego śródbłonka małych naczyń krwionośnych obecnych w *lamina propria* i nieobecność reakcji w błonie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego kieszonki przyzębnej.

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: (**F, G**) intensywne reakcja immunocytochemiczna na kolagen typu IV w błonach podstawnych komórek *endothelium* HEV; pojedyncze lub wyraźne struktury włóknkowe i/lub komórki siateczki z pozytywną reakcją na to białko rozproszone w tkance łącznej siateczkowej węzła chłonnego.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-G).

**Fot. 8.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP)** z immunocytochemiczną lokalizacją **lamininy** w typowych naczyniach dziąsła (**A**) oraz w naczyniach HEV (**B, C, D**): (**A**) intensywna reakcja na lamininę w błonach podstawnych śródbłonka zwykłych naczyń krwionośnych dziąsła obecnych w *lamina propria*; (**B**) silna ekspresja lamininy w części przypodstawnej HEV oraz oplatająca całe naczynie krwionośne; (**C, D**) wyraźna reakcja immunocytochemiczna na lamininę w ścianie licznych HEV dziąsła pacjentów z CP, a także w błonie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego kieszonki przyzębnej (strzałki).

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1)**: (**E**) zwraca uwagę ekspresja lamininy na obwodzie komórek płaskiego śródbłonka małych naczyń krwionośnych obecnych w *lamina propria* oraz pozytywna reakcja immunocytochemiczna w błonie podstawnej nabłonka wielowarstwowego płaskiego kieszonki przyzębnej (strzałka). Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2)**: (**F, G, H**) zróżnicowana reakcja immunocytochemiczna na lamininę, od przeciętnej do bardzo intensywnej ekspresji (**H**) w błonach podstawnych komórek *endothelium* HEV.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-H).

**Fot. 9.** Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia** (CP) z immunocytochemiczną lokalizacją **VEGF (A-D)**; **(A)** Nieliczne, pojedyncze VEGF-pozytywne komórki (makrofagi, monocyty) w *lamina propria* dziąsła; **(B-D)** liczniejsze VEGF-immunopoztywne jednojądrzaste komórki w naciekach zapalnych dziąsła; zwraca uwagę nieobecność lub słaba reakcja na ten czynnik wzrostowy w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych dziąsła niezależnie od typu naczynia (zwykle, HEV) **(B-D)**. Nie obserwowano ekspresji VEGF w komórkach nabłonka dziąsła i/lub kieszonki przyzębnej.

Fragmenty błony śluzowej dziąsła **pacjentów ze zdrowym przyzęciem (K1): (E, F)** zwraca uwagę bardzo słaba reakcja na VEGF i to w pojedynczych komórkach jednojądrzastych i/lub *endothelium* naczyń krwionośnych

Fragmenty **odczynowych węzłów chłonnych (grupa K2): (G)** lokalizacja VEGF w błonach komórkowych nielicznych komórek mięszu węzła chłonnego, nieobecność pozytywnego odczynu w komórkach *endothelium* HEV.

Technika ABC. Podbarwienie hematoksyliną. Optyka Nomarskiego.

Powiększenie obiektywu 40x (A-G).