

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Disertační práce

RNDr. Zuzana Krátká

**IMUNITNÍ MECHANISMY
V PATOGENEZI PARODONTITIDY**

Vedoucí disertační práce: RNDr. Jiřina Bártová, CSc.

Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN

Vinohradská 48, Praha 2

Praha, 2006

Ráda bych poděkovala vedení Výzkumného ústavu stomatologického, VFN, Praha za možnost vypracování disertační práce na tomto pracovišti v rámci výzkumných projektů MZ ČR. Zejména bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřině Bártové, CSc. za dlouholeté vedení, podporu a přátelství. Děkuji též kolegům, kteří velkým dílem pomohli tam, kde již moje znalosti nedostačovaly.

Na závěr bych chtěla velmi poděkovat mojí rodině, zejména manželovi a rodičům, bez jejichž pomoci a duševní podpory by tato práce nevznikla.

1. OBSAH

1. OBSAH	5
2. SEZNAM ZKRATEK	8
3. ÚVOD	11
4. PŘEHLED POZNATKŮ	12
4.1. ONEMOCNĚNÍ PARODONTU	12
4.1.1. <i>Stavba parodontu a průběh onemocnění</i>	12
4.1.2. <i>Diagnostika a léčba parodontitidy</i>	13
4.1.3. <i>Typy parodontitid</i>	14
4.1.3.1. Chronická gingivitida.....	14
4.1.3.2. Parodontitida dospělých – Adult periodontitis (AP).....	15
4.1.3.3. Časná parodontitida - Early onset periodontitis (EOP).....	15
4.1.3.3.1. Prepubertální parodontitida (PP).....	15
4.1.3.3.2. Juvenilní parodontitida (JP).....	16
4.1.3.3.3. Rychle progredující parodontitida (RPP).....	16
4.2. RIZIKOVÉ FAKTORY V PATOGENEZI PARODONTITIDY	17
4.2.1. <i>Genetická predispozice</i>	17
4.2.1.1. Geny sledované v souvislosti s rozvojem parodontitidy.....	18
4.2.2. <i>Fyziologické faktory: věk, pohlaví a rasa pacientů</i>	19
4.2.3. <i>Kouření</i>	20
4.2.4. <i>Hygiena dutiny ústní</i>	21
4.2.5. <i>Patogenní bakterie</i>	21
4.2.5.1. Složení mikroflóry dutiny ústní	21
4.2.5.2. Složky bakterií ovlivňující imunitní odpověď.....	23
4.2.5.3. Význam patogenních bakterií v patogenезi parodontitidy	25
4.3. SYSTÉMOVÁ ONEMOCNĚNÍ, KTERÁ VEDOU K ROZVOJI PARODONTITIDY	26
4.3.1. <i>Systémová onemocnění spojená s poruchou funkce neutrofilních granulocytů</i>	26
4.3.2. <i>Diabetes mellitus - cukrovka</i>	26
4.3.3. <i>HIV onemocnění</i>	27
4.3.4. <i>Osteoporóza</i>	27
4.3.5. <i>Parodontitida jako rizikový faktor pro rozvoj systémových onemocnění</i>	28
4.3.5.1. Parodontitida jako rizikový faktor rozvoje aterosklerózy	28
4.3.5.1.1. Vznik a rozvoj aterosklerózy	28
4.3.5.1.2. Význam apolipoproteinu E a B v metabolismu tuků	30
4.3.5.1.3. Onemocnění parodontu a ateroskleróza.....	31
4.4. IMUNITNÍ MECHANISMY V PATOGENEZI PARODONTITIDY	33
4.4.1. <i>Mechanismy nespecifické imunity</i>	33
4.4.2. <i>Mechanismy specifické imunity</i>	35
4.4.2.1. Antigen prezentující buňky.....	35

4.4.2.2.	T lymfocyty.....	36
4.4.2.2.1.	Význam T lymfocytů v patogenezi onemocnění parodontu.....	38
4.4.2.2.2.	Význam regulačních T buněk v regulaci autoimunitních procesů.....	41
4.4.2.3.	B lymfocyty	42
4.4.2.3.1.	Polyklonální aktivace B lymfocytů a tvorba autoprotilátek	43
4.5.	ZÁVĚRY	44
5.	CÍLE PRÁCE.....	45
6.	MATERIÁL A METODY.....	47
6.1.	CHARAKTERISTIKA PACIENTŮ A KONTROLNÍCH OSOB	47
6.1.1.	<i>Pacienti s časnou parodontitidou.....</i>	47
6.1.2.	<i>Zdraví sourozenci a kontrolní osoby.....</i>	47
6.1.3.	<i>Klinické vyšetření a konzervativní terapie.....</i>	48
6.2.	ROZTOKY A CHEMIKÁLIE	49
6.3.	ODBĚR MATERIÁLU.....	51
6.3.1.	<i>Odběr sulkulární tekutiny.....</i>	51
6.3.2.	<i>Odběr krve.....</i>	52
6.4.	MIKROBIOLOGICKÁ STUDIE.....	52
6.4.1.	<i>Kultivace bakterií.....</i>	52
6.4.2.	<i>Detekce bakterií pomocí reverzní hybridizace bakteriální DNA.....</i>	52
6.5.	GENETICKÉ VYŠETŘENÍ.....	54
6.5.1.	<i>Využití metody hybridizace DNA k detekci IL-1A a IL-1B polymorfismu a HLA-DR4.....</i>	54
6.5.2.	<i>Využití metody hybridizace DNA k detekci polymorfismu apolipoproteinu E (ApoE) a apolipoproteinu B (ApoB)</i>	55
6.6.	IMUNOLOGICKÁ VYŠETŘENÍ	56
6.6.1.	<i>Izolace mononukleárních a polymorfonukleárních buněk z periferní krve.....</i>	56
6.6.2.	<i>Kvantitativní stanovení tetrazoliumreduktázové aktivity polymorfonukleárních buněk (INT test)</i>	56
6.6.3.	<i>Stimulace buněk k tvorbě cytokinů a imunoglobulinů</i>	57
6.6.4.	<i>Detekce počtu buněk produkujících cytokiny metodou ELISPOT</i>	58
6.6.5.	<i>Počítačové hodnocení metody ELISPOT.....</i>	59
6.6.6.	<i>Stanovení koncentrace imunoglobulinů metodou ELISA.....</i>	60
6.6.7.	<i>Stanovení koncentrace cytokinů metodou ELISA.....</i>	60
6.6.8.	<i>Detekce produkce cytokinů screeningovou metodou RayBio®.....</i>	60
6.6.9.	<i>Využití počítačového programu LUCIA 4.80 ke zhodnocení výsledků metody RayBio®</i>	62
6.6.10.	<i>Stanovení koncentrace cytokinů pomocí multiplexové analýzy na přístroji Luminex.....</i>	63
6.6.11.	<i>Klinické a biochemické laboratorní vyšetření.....</i>	64
7.	VÝSLEDKY	65
7.1.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST Č. 1	65
7.1.1.	<i>Výsledky klinické studie.....</i>	65

7.1.2.	<i>Výsledky mikrobiologické studie</i>	68
7.1.3.	<i>Vyšetření polymorfismu IL-1A a IL-1B genů</i>	69
7.1.4.	<i>Interleukin-1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early-onset periodontitis</i>	70
7.2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST Č. 2.....	83
7.2.1.	<i>Funkce neutrofilních granulocytů</i>	83
7.3.	EXPERIMENTÁLNÍ STUDIE Č. 3.....	84
7.3.1.	<i>Produkce cytokinů a imunoglobulinů po in vitro stimulaci mononukleárních buněk pacientů s EOP a jejich zdravých sourozenců</i>	84
7.3.2.	<i>Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings</i>	86
7.4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST Č. 4.....	92
7.4.1.	<i>Využití metody ELISPOT k detekci buněk produkujících cytokiny po stimulaci bakteriemi</i>	92
7.4.1.1.	Charakteristika spotů.....	92
7.4.1.2.	Tvorba spotů po bakteriální stimulaci	93
7.4.2.	<i>Produkce cytokinů po bakteriální stimulaci</i>	98
7.4.3.	<i>Produkce imunoglobulinů po bakteriální stimulaci</i>	101
7.4.3.1.	Výsledky dlouhodobé studie.....	102
7.5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST Č. 5.....	105
7.5.1.	<i>Produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM a PWM+ConA u pacientů s časnou parodontitidou – výsledky dlouhodobé studie</i>	105
7.5.2.	<i>Vztah mezi progresí onemocnění parodontu a inhibicí tvorby imunoglobulinů</i>	108
7.5.3.	<i>Inhibice tvorby imunoglobulinů u pacientů s imunodeficitním onemocněním</i>	110
7.5.3.1.	Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency	113
7.5.4.	<i>Screeningová analýza produkce cytokinů po stimulaci PWM a PWM+ConA pomocí metody RayBio®</i>	122
7.5.5.	<i>Stanovení koncentrace cytokinů po stimulaci PWM a PWM+ConA pomocí multiplexové analýzy</i>	125
7.6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST Č. 6.....	127
7.6.1.	<i>Vyšetření polymorfismu genů pro apolipoprotein E (apo ε) a apolipoprotein B (apo B) ...</i>	127
7.6.2.	<i>Biochemická a imunologická vyšetření sér pacientů</i>	128
8.	DISKUSE	131
9.	ZÁVĚRY	147
10.	SEZNAM LITERATURY	151

2. SEZNAM ZKRATEK

A. a. – *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

AP - Adult Periodontitis (parodontitida dospělých)

APC – Antigen Presenting Cell

apo - Apolipoprotein

CAL – ztráta úponu (clinical attachment loss)

C-CR – receptor pro C-CR chemokiny

CDT – Cytolethal Toxin

ConA – Concanavalin A

CTLA-4 – Cytotoxic T Lymphocytes Associated Protein - 4

CX-CR – Receptor pro C-X-C chemokiny

CPITN – Community Periodontal Index of Treatment Needs

CRP – C-reaktivní protein

CVID – Common Variable Immunodeficiency (Běžný variabilní imunodeficit)

DTH – Delayed Type Hypersensitivity (přecitlivělost oddáleného typu)

EOP – Early Onset Periodontitis (časná parodontitida)

F. nucleatum – *Fusobacterium nucleatum*

fMLP- Formyl-methionyl peptid

GI – gingivální index

GJP – Generalised Juvenile Periodontitis (generalizovaná juvenilní parodontitida)

GroEL – stresový protein

HDL – high – density lipoprotein

HLA – Human Leukocyte Antigens

HSP - Heat Shock Protein

ICAM – Intercellular Adhesion Molecules

IDDM- Insulin – Dependent Diabetes Mellitus (diabetes I.typu)

IgA - Imunoglobulin A

IgE - Imunoglobulin E

IgG - Imunoglobulin G

IgGSD – IgG selektivní imunodeficit

IL - Interleukin

INF γ - Interferon γ

- IP-10 – Interferon - Inducible Protein 10
- JP - Juvenile Periodontitis (juvenilní parodontitida)
- LAD - Leukocyte Adherence Deficiency
- LAK – Lymphokine activated killer cells
- LBP - Lipid Binding Protein
- LDL – Low- Density Lipoprotein (lipoprotein nízké denzity)
- LFA-1 - Lymphocyte function-associated antigen
- LJP - Localised Juvenile Periodontitis (lokalizovaná juvenilní parodontitida)
- LPS – Lipopolysacharid
- LtxA –Leukotoxin A
- MCP – Monocyte Chemoattractant Protein
- MHC – hlavní histokompatibilní komplex
- MIP - Macrophage inflammatory protein
- MMP – Matrixová metaloproteináza
- NK - Natural Killer
- NKT – Nature killer T cell
- OPG – Osteoprotegrin
- OPGL – Osteoprotegrin Ligand
- ox- LDL – Oxidalized Low-Density Lipoprotein (oxidovaný lipoprotein nízké denzity)
- PAMP – Pathogen – Associated Molecular Pattern
- PBS – fosfát fyziologický roztok
- PRR – Pattern Recognition Receptor
- P. intermedia* – *Prevotella intermedia*
- P. gingivalis* – *Porphyromonas gingivalis*
- PD- hloubka chobotu (probing depth)
- PGE₂ – Prostaglandin E₂
- PGN - peptidoglykan
- PMN - Polymorfonukleární buňka (neutrofilní granulocyt)
- PP - Prepubertal Periodontitis (prepubertální parodontitida)
- PWM – Pokeweed mitogen
- RANK – Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B
- RANKL - Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand
- RANTES – Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted

RPP – Rapidly Progressive Periodontitis (rychle progredující parodontitida)

SI – stimulační index

Tc – cytotoxický T lymfocyt (CD8+)

TCR – T receptor

TGF – Transforming- Growth Factor

Th - pomocný T lymfocyt (CD4 +)

Tr – regulační T lymfocyt

TLR – Toll-like receptor

TNF - Tumor Necrosis Factor

VLDL – Very Low- Density Lipoprotein

VÚS – Výzkumný ústav stomatologický

Zym - zymozan

3. ÚVOD

Parodontitida je chronické zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubů – parodontu, které může vést k uvolnění a následně ke ztrátám zubů. Léčení parodontitidy a jejích následků představuje značné finanční náklady, a proto je velké úsilí věnováno studiu faktorů vedoucích k jeho vzniku a progresi.

Akumulace bakterií zubního plaku a jejich průnik do tkáně je primární příčinou rozvoje zánětlivé reakce v parodontu. Při léčbě parodontitidy se používá v první řadě konzervativní terapie spočívající v mechanickém odstranění bakterií. Proto parodontitida představuje ideální model ke studiu průběhu chronické zánětlivé reakce u lidí.

První známky časné fáze parodontitidy dospělých se objevují v rané dospělosti pacientů. Proto je třeba věnovat zvýšenou péči nejen rozpoznání časných stádií onemocnění u mladých osob, ale zároveň je nezbytné sledovat změny v imunitní reakci pacientů v dlouhodobém horizontu. Na základě těchto údajů může být přesněji určena prognóza vývoje onemocnění a terapie u pacientů.

Parodontitida představuje také závažné riziko pro rozvoj dalších systémových onemocnění. Významný je její vliv zejména na vznik a průběh cévních onemocnění.

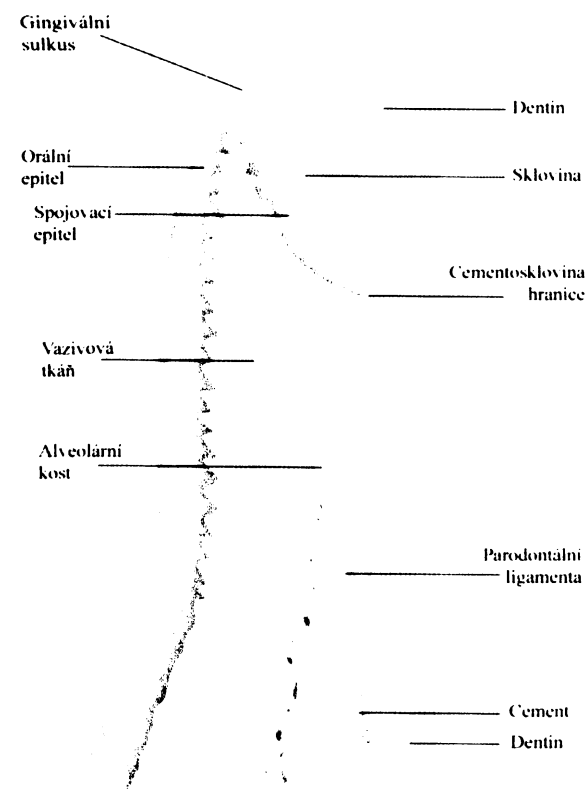
4. PŘEHLED POZNATKŮ

4.1. Onemocnění parodontu

4.1.1. Stavba parodontu a průběh onemocnění

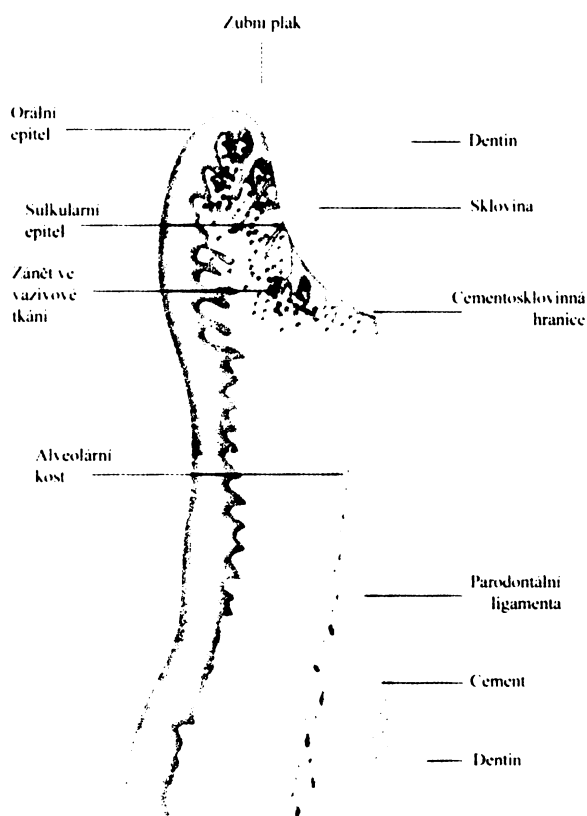
Parodont je závěsný aparát zubů, jehož hlavní funkcí je připojení jednotlivých zubů k alveolární kosti (Rateitschak a spol. 1989). Skládá se z dásně (gingivy), zubního cementu, alveolární kosti, parodontálních vazů a z příslušného cévního a nervového zásobení (Obr. č. 1).

Pro vznik parodontitidy je nejdůležitější oblastí ta část parodontu, kde spolu anatomicky sousedí povrch zubu (sklovina, cement) a gingiva (epitel, vazivo). Spojení zubu s gingivou je tvořeno úponovým epitelem, který vytváří kolem zubu jemný žlábek – gingivální sulkus. Z tkáně je do sulku produkována sulkulární tekutina. Produkty mikroorganismů, které jsou obsaženy v zubním plaku na povrchu zubů, pronikají do gingiválního sulku a dále úponovým epitelem gingivy do tkáně. Odpovědí na jejich působení je imunitní reakce v tkáni a zvýšená produkce sulkulární tekutiny.

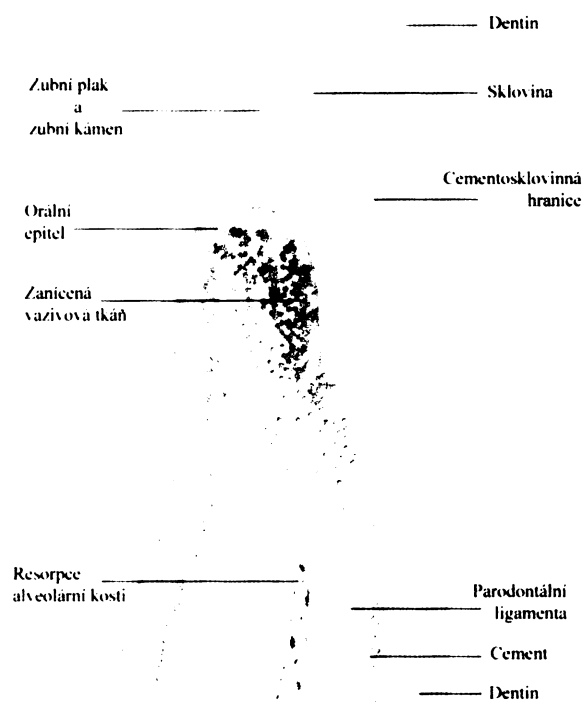


Obrázek č. 1 – Stavba zdravého parodontu
(Rose a Mealey 2004)

U **zdravého parodontu** je tento proces v rovnováze. Pokud je narušena a bakterie začnou pronikat do tkáně, dojde k rozvoji počátečního stádia onemocnění - **gingivitidy** (Obr. č. 2). V této fázi onemocnění dochází k rozvoji akutní zánětlivé reakce s cílem odstranit patogenní bakterie a jejich složky. Pokud nejsou odstraněny, akutní zánětlivá reakce přechází v chronickou, zvětšuje se rozsah zánětu a dochází k rozvoji **parodontitidy** (Obr. č. 3). Zasaženy jsou zejména závěsné vazy v místě jejich napojení na cement zubního kořene.



Obrázek č. 2 – Gingivitida
(Rose a Mealey 2004)



Obrázek č. 3 – Parodontitida
(Rose a Mealey 2004)

Postižené místo přerůstá epitel gingiválního sulku, který se prohlubuje a mění v tzv. parodontální chobot. Zároveň dochází k resorpci alveolární kosti. Dále se zeslabuje závěsný aparát zubů a v konečném stádiu hrozí jejich úplná ztráta. Zasaženy zánětem mohou být jen některé zuby (lokalizovaná forma) nebo celý chrup najednou (generalizovaná forma) (Page 1999).

4.1.2. Diagnostika a léčba parodontitidy

K diagnostice parodontitidy se používají následující metody: Nejprve se zhodnotí stav dásně. Zánět dásně, který se projevuje otokem a zarudnutím, se hodnotí pomocí gingiválního indexu (GI). Poté se pomocí kalibrované sondy změří hloubka gingiválního sulku resp. parodontálních chobotů (tzv. probing depth – PD). Ztráta úponu se popisuje indexem CAL (tzv. clinical attachment loss) a úbytek kostní tkáně se stanovuje z rentgenových snímků (tzv. alveolar bone loss).

Základní léčbou onemocnění parodontu je konzervativní terapie (Page a Beck 1997), která spočívá v odstranění příčin onemocnění. Stomatolog odstraní z povrchu zubů a kořene zubní plak či zubní kámen, případně opraví nevyhovující výplně a korunky. Zároveň je

nezbytné naučit pacienta správné péči o chrup, tj. správnému způsobu čištění zubů, masáži dásní, používání zubní nitě, výplachům roztokem chlorhexidinu atd. Tato léčba je zpravidla účinná a vede ke zlepšení stavu parodontu.

U pacientů s progresivním onemocněním se používá také chirurgická léčba. Pacientům mohou být rovněž podávána systémově nebo lokálně antibiotika (např. tetracyklin) nebo chemoterapeutika (metronidazol).

4.1.3. Typy parodontitid

Klasifikace parodontitid byla v průběhu posledních desetiletí několikrát změněna (Tab. č. 1). V současné době se v České republice používá klasifikace schválená v roce 1989 na Světové konferenci klinické parodontologie (American Academy of Periodontology 1989). Tato klasifikace byla dále zjednodušena na 1. evropském parodontologickém kongresu (Attström a van der Velden 1994). Nejnovější klasifikační systém, který je používán v USA a schvaluje se jeho zavedení v zemích Evropské unie, byl přijat v roce 1999 na Mezinárodním parodontologickém kongresu (Armitage 1999).

V následujícím přehledu parodontálních onemocnění jsou uvedeny pouze typy parodontálních onemocnění sledované v rámci disertační práce.

4.1.3.1. Chronická gingivitida

Chronická gingivitida je charakterizována pouze zánětem gingivy bez přítomnosti parodontálních chobotů a bez detekovatelné ztráty alveolární kosti nebo poruchy závěsného aparátu. Její příčinou je buď nahromadění plaku, léčba některými léky a nebo zvýšené hladiny steroidních hormonů. Vyskytuje se již u dětí, ale nejzávažnější je v období puberty. V pozdějším věku její výskyt klesá (Stamm 1986).

Tabulka č. 1 - Klasifikace parodontitid

Světový kongres klinické parodontologie (1989)

I.	Parodontitida dospělých
II.	Časná parodontitida
	A. Prepubertální parodontitida
	B. Juvenilní parodontitida - generalizovaná, lokalizovaná
	C. Rychle progredující parodontitida
III.	Parodontitida asociovaná se systémovými onemocněními
IV.	Nekrotizující ulcerativní parodontitida
V.	Refraktorní parodontitida

1. evropský parodontologický kongres (1994)

-
- | | |
|------|-----------------------------|
| I. | Časná parodontitida |
| II. | Parodontitida dospělých |
| III. | Nekrotizující parodontitida |

Mezinárodní parodontologický kongres (1999)

-
- | | |
|-------|--|
| I. | Onemocnění gingivy |
| II. | Chronická parodontitida – lokalizovaná, generalizovaná |
| III. | Agresivní parodontitida - lokalizovaná, generalizovaná |
| IV. | Parodontitida jako projev systémového onemocnění |
| V. | Nekrotizující onemocnění parodontu |
| VI. | Parodontální absces |
| VII. | Parodontitida spojená s endodontickými lézemi |
| VIII. | Vývojové a získané deformity |
-

4.1.3.2. Parodontitida dospělých – Adult periodontitis (AP)

Parodontitida dospělých postihuje 70 – 80 % pacientů starších 35 let (Rateitschak a spol. 1989) a představuje 95 % všech onemocnění parodontu. Zasaženy jsou zpravidla všechny zuby, nejvíce však moláry (stoličky) a frontální zuby. Gingiva bývá postižena fibrózou a svažuje se. Dochází k nepravidelné destrukci alveolární kosti, což u 18 % AP pacientů vede ke ztrátě zubů. V parodontálních chobotech jsou detekovány *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) a *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*).

4.1.3.3. Časná parodontitida - Early onset periodontitis (EOP)**4.1.3.3.1. Prepubertální parodontitida (PP)**

Toto závažné onemocnění se vyskytuje u dětí již ve věku 5 – 8 let, u kterých postihuje mléčný i smíšený chrup (Page a spol. 1983). PP je charakterizovaná zánětem dásně, rychlou ztrátou kosti a viklavostí až úplnou ztrátou zubů. Vyskytuje se jak v lokalizované formě (tj. postihuje < 30 % zubů), tak v generalizované formě (tj. postihuje > 30 %). V plaku pacientů s PP jsou detekovány *A. a.*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* a *F. nucleatum* (Delaney a Kornman 1987). Dále se u pacientů vyskytují defekty funkce neutrofilů nebo monocytů.

Prepubertální parodontitida se vyskytuje zejména u pacientů, kteří mají závažné systémové onemocnění, např. diabetes mellitus I. typu, Papillon –Lefèvreův syndrom, hypoplazii, LAD (Leukocyte Adhesion Deficiency) syndrom, Downův syndrom, AIDS,

Chediak – Higashi syndrom atd. (Page a spol. 1983). Prevalence PP je 0,84 – 4,5 % v závislosti na použitých diagnostických kritériích (Wat nabe 1990, Meyle 1994).

4.1.3.3.2. Juvenilní parodontitida (JP)

Juvenilní parodontitida postihuje děti a mladé osoby, které netrpí systémovými onemocněními (Baer 1971). Při lokalizované formě (LJP) dochází ke kráterovité resorpci alveolární kosti u jednotlivých zubů stálého chrupu, nejčastěji u řezáků či prvních molárů. Pro LJP je charakteristický slabý zánět dásní. V subgingiválním plaku se vyskytuje bakterie *A. a.* (Slots 1979). U generalizované formy (GJP) je zasažena většina zubů stálého chrupu horizontální resorpcí alveolární kosti. Typická je přítomnost bakterií *P. gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *P. intermedia*, *Capnocytophaga* a *Neisseria*.

Přibližně u 75 % pacientů s JP jsou detekovány poruchy fagocytózy a chemotaxe neutrofilních granulocytů (Suzuki a spol. 1984, Van Dyke a spol. 1987).

Prevalence JP je 0,1 % až 15 % (Sjödin a spol. 1993, Hart a spol. 1997), vyšší prevalence JP byla zjištěna u afroamerické (10 %) a latinskoamerické (5,5 %) populace než u bělochů (1,3 %) (Albandar a spol. 1997).

4.1.3.3.3. Rychle progredující parodontitida (RPP)

První známky onemocnění se objevují u mladých lidí mezi pubertou a 30. rokem (Rateitschak a spol. 1989). Průběh onemocnění je extrémně rychlý a cyklický a může mu předcházet LJP. Zasaženy jsou buď jen některé anebo všechny zuby. V zubním plaku dominují *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. a.*, *F. nucleatum* a spirochéty. Prevalence onemocnění je 2-5 % populace. Ve výskytu tohoto onemocnění hraje významnou roli genetická predispozice vázaná na X - chromosom.

V roce 1999 bylo přistoupeno na zavedení nového klasifikačního systému bez věkového omezení (Armitage a spol. 1999). V nejnovějším klasifikačním systému je parodontitida dospělých nahrazena termínem chronická parodontitida, přičemž jsou do této kategorie zařazeni také mladší pacienti s chronickým průběhem onemocnění. Chronická parodontitida je dále rozdělena na lokalizovanou (postihuje < 30 % chrupu) a generalizovanou chronickou parodontitidu (postihuje > 30 % chrupu). Závažnost onemocnění závisí na hodnotě CAL indexu, kdy mírná forma má hodnoty CAL 1-2 mm, středně závažná forma má hodnoty CAL 3-4 mm a závažná forma má hodnoty CAL > 5 mm.

Časná parodontitida je nahrazena termínem „agresivní parodontitida“ (Armitage a spol. 1999). Pacienti netrpí systémovým onemocněním, avšak progresi parodontitidy je velmi rychlá. Postižen je závěsný aparát a rovněž dochází k rychlé resorpci alveolární kosti.

Onemocnění je přenášeno v rodinách. U pacientů je prokázána přítomnost *A. a.* a *P. gingivalis*. Zároveň je detekována porucha funkce polymorfonukleárních buněk a zvýšená produkce prostaglandinu E₂ (PGE₂) a IL-1β. Agresivní parodontitida je dále rozdělena na dvě kategorie – lokalizovanou a generalizovanou a stejně jako chronická parodontitida se dělí na mírnou, střední a těžkou formu.

Dále byla vytvořena nová kategorie a to „Parodontitida jako projev celkového onemocnění“ (Armitage a spol. 1999). Do této kategorie jsou zařazeni pacienti s parodontidou, kteří navíc mají systémové onemocnění, které ovlivňuje stav parodontu jako jsou diabetes mellitus I. typu, Papillon–Lefèvre syndrom, hypoplázie, LAD syndrom, Downův syndrom, AIDS, Chediak – Higashi syndrom a další.

4.2. Rizikové faktory v patogenezi parodontitidy

Patogenní bakterie jsou primární příčinou rozvoje onemocnění, ale samotná jejich přítomnost není dostačující k rozvoji onemocnění. Mezi rizikové faktory, které se spolupodílejí na rozvoji parodontitidy, patří genetická predispozice, snížená funkce neutrofilních granulocytů, kouření, vyšší věk, některá systémová onemocnění, léčba ozářením či imunosupresivními léky a rovněž nedostatečná hygiena (Page 1997).

4.2.1. Genetická predispozice

Primární citlivost k rozvoji onemocnění parodontu je dána genotypem každého jedince (Michalowicz 1994). V patogenezi tohoto onemocnění se mohou uplatňovat mutace řady genových lokusů. Těžké formy parodontitidy postihují přibližně 10 – 15 % populace (Jenkins a Kinane 1989). Prepubertální parodontitida, lokalizovaná agresivní parodontitida a generalizovaná agresivní parodontitida jsou pravděpodobně způsobeny mutací v genech, které jsou děděny autozomálně dominantně s redukovanou penetrací. To znamená, že je zde přítomno několik různých genových lokusů, které, pokud zmutují, mohou způsobit rozvoj onemocnění. Redukovaná penetrace znamená, že u nositele rizikové mutace může, ale nemusí onemocnění propuknout, záleží na přítomnosti dalších rizikových faktorů (Marazita a spol. 1994, Kinane a Hart 2003).

Těžké formy parodontitidy doprovázejí řadu monogeneticky děděných onemocnění. Prepubertální parodontitida a lokalizovaná juvenilní parodontitida se vyskytují u pacientů se syndromem LAD I a LAD II (Springer a spol. 1984, Etzioni a Tonetti 2000). Pacienti s LAD I syndromem mají defektní expresi adhesivní molekuly CD18 (součást LFA-1), která je nutná k vazbě neutrofilů na endotel. Neutrofilů s defektem CD18 proto nemohou migrovat

z cévního řečiště na místo bakteriální infekce. Pacienti s LAD II syndromem mají defektní expresi adhezivní CD15 molekuly, která obsahuje cukernatou strukturu nazývanou sialyl Lewis^x, která reaguje s P-, E- a L- selektiny exprimovanými na povrchu endotelových buněk. Pacienti jsou postiženi častými bakteriálními infekcemi, které mohou vést až k předčasnému úmrtí pacienta. Dědičnost LAD syndromu je autozomálně recesivní.

Generalizovaná gingivitida, rozsáhlá ztráta alveolární kosti a předčasná ztráta zubů se vyskytují také u pacientů s Chediak-Higashi syndromem (Temple a spol. 1972, Shibutani a spol. 2000). Chediak-Higashi syndrom je onemocnění imunitního systému způsobené poruchou chemotaxe a baktericidních mechanismů neutrofilních granulocytů, které ústí v chronické infekce. Onemocnění je doprovázeno sníženou pigmentací kůže a očí a neurologickými problémy. V důsledku komplikací dochází i k předčasnému úmrtí. Onemocnění je autozomálně recesivní.

Různě závažné formy parodontitidy se vyskytují také u pacientů s Papillon-Lefèvre syndromem. Toto onemocnění je způsobeno mutací genů pro cathepsin, která vede k abnormální keratóze (Gorlin a spol. 2001). Onemocnění je děděno autozomálně recesivně.

4.2.1.1. Geny sledované v souvislosti s rozvojem parodontitidy

Genetická výbava každého jedince mj. určuje, jakým způsobem reaguje organismus na přítomnost určitého antigenu. Také vývoj a regulace imunitní odpovědi v patogenezi parodontitidy jsou do značné míry genově specifické a závisejí zejména na lokální tvorbě a množství celé řady cytokinů a na expresi dalších biologicky aktivních molekul.

IL-1 α a IL-1 β patří mezi cytokiny, které mají prozánětlivý účinek a stimulují resorpci alveolární kosti a regulují proliferaci fibroblastů (Graves a Cochran 2003). Kornman a spol. (1997) zjistili asociaci mezi parodontitidou a polymorfizmem v genech kódujících IL-1 α (záměna nukleotidů C \rightarrow T v pozici -889) a IL-1 β (záměna nukleotidů C \rightarrow T v pozici +3953). Kombinace těchto dvou rizikových genů, tzv. IL-1 kombinovaný genotyp, byla zjištěna u pacientů s parodontitidou (Kornman a spol. 1997, Parkhill a spol. 2000, Lang a spol. 2000). Vztah mezi parodontitidou a IL-1 kombinovaným genotypem však nebyl potvrzen v řadě jiných publikací (např. Hodge a spol. 2001, Engebretson a spol. 1999,

IL-1 genotyp je pouze jedním z rizikových faktorů, jehož účinek na rozvoj onemocnění se uplatní až za přítomnosti dalších rizikových faktorů jako např. přítomností patogenních bakterií či kouření (Cullinan a spol. 2001).

Dalším ze sledovaných genových polymorfismů, u něhož se prokázal vztah s rozvojem parodontitidy byl gen pro IL-6. Hollá a spol. (2004b) zjistili signifikantně nižší heterozygotní

kombinace G/C v pozici -572 v promotoru genu pro IL-6 u pacientů s chronickou parodontitidou než u zdravých osob. Hollá a spol. (2002) sledovali také polymorfismus v promotoru genu pro CD14. V tomto místě se vyskytuje polymorfismus ve dvou lokalitách C(-159)T a G (-1359)T. Autoři zjistili, že G v pozici G(-1359)T se signifikantně častěji objevuje u pacientů s rozvinutou parodontitidou dospělých než u pacientů s mírnou parodontitidou dospělých. Homozygotní genotyp GG byl signifikantně častěji detekován u pacientů s rozvinutou parodontitidou než u pacientů s mírnou parodontitidou.

U pacientů s časnou parodontitidou byla zjištěna také zvýšená frekvence alel HLA-DRB1*1501-DQB1*602 (Takashiba a spol. 1999). U EOP pacientů s tímto haplotypem byla zároveň potvrzena signifikantně vyšší T buněčná odpověď proti membránovému antigenu izolovanému z *P. gingivalis*. Procházková a spol. (1994) zjistili u českých pacientů s časnou parodontitidou signifikantně vyšší výskyt HLA-B13 a HLA-B15, než je jejich průměrná frekvence v české populaci.

Vztah mezi parodontitidou a polymorfizmem genů byl testován také u genů pro IL-10 (Kinane a spol. 1999), tumor necrosis factor (TNF)- α (Kinane a spol. 1999), Fc- γ receptory (Kobayashi a spol. 1997), transforming growth factor (TGF)- β (Hollá a spol. 2002), toll-like receptor TLR-2 (Bochud a spol. 2003), TLR-4 (Arbour a spol. 2000), receptor pro vitamin D (Inagaki a spol. 2003), matrixovou metaloproteinázu (MMP)-1 (Izakovičová-Hollá a spol. 2004). V těchto studiích však nebyly zjištěny žádné průkazné závislosti mezi genovým polymorfizmem a parodontitidou.

Současné znalosti genetického pozadí parodontitidy jsou ještě velmi omezené a neumožňují na základě genetického vyšetření vytipovat rizikové skupiny pacientů (Loos a spol. 2005). Velmi významné je proto klinické sledování sourozenců pacientů s agresivní parodontitidou. Ti logicky patří mezi jedince s vysokým rizikem rozvoje onemocnění parodontu a je tedy možné u nich včas zachytit počáteční změny na parodontu a zahájit jejich léčbu. Zároveň se intenzivně pracuje na vytvoření tzv. „High risk“ genového profilu, který by mohl být použit při screeningovém vyšetření pacientů (Kinane a Hart, 2003).

4.2.2. Fyziologické faktory: věk, pohlaví a rasa pacientů

Účinnost imunitního systému obecně souvisí s aktuálním fyziologickým stavem organismu. Není tedy překvapivé, že frekvence výskytu parodontitidy se zvyšuje se vzrůstajícím věkem (Heitz - Mayfield 2005). Vztah mezi poškozením parodontu a věkem pacienta je významným kritériem pro určení závažnosti další progresu onemocnění. Stejně

hodnoty CAL znamenají pro mladého pacienta horší prognózu vývoje onemocnění než pro starého pacienta. Nejzávažnější formy onemocnění se vyskytují v pubertě a ranné dospělosti.

Parodontitidou jsou více postiženi muži (Albandar 2002). Zvláštní skupinou ohrožených osob jsou ženy v období přechodu (Norderyd a spol. 1999). Bylo prokázáno, že ženy ve věku 50 - 64 let, které užívají estrogenní léčbu, mají nižší krvácivost dásní než ženy bez léčby.

Výskyt parodontitidy je ovlivněn také rasou pacientů (Van Dyke a spol. 1970, Oliver a spol. 1998, Albandar 2002). Častější výskyt parodontitidy byl zjištěn u afroamerické, latinskoamerické a asijské populace než u bělochů.

4.2.3. Kouření

Mezi významné vnější faktory ovlivňující rozvoj parodontitidy patří kouření. U kuřáků jsou pravidelně detekovány vyšší změny v závěsném aparátu, vyšší ztráty alveolární kosti i vyšší ztráty zubů než u nekuřáků (Kinane a Chestnutt 2000). Paradoxně u kuřáků jsou zjišťovány nižší hodnoty zánětu dásní než u nekuřáků. Je to podmíněno tím, že kouření snižuje krvácivost dásní (Preber a Bergström 1986) a ovlivňuje cévní zásobení v postižené tkáni (Mirbod a spol. 2001). Kouření rovněž přímo ovlivňuje složení mikroflóry – u kuřáků se vyskytuje vyšší počet parodontálních patogenů než u nekuřáků (Haffajee a Socransky 2001).

Kouření dále negativně ovlivňuje funkci imunitního systému. Na povrchu neutrofilů jsou přítomny receptory pro různé složky kouře např. pro nikotin a cotinin (Benhammou a spol. 2000). Kouření stimuluje i proteolytickou aktivitu neutrofilů (Donaldson a spol. 1991), což vede ke zvýšené koncentraci matrixových metaloproteináz a elastáz v tkáních parodontu (Soder a spol. 2002). Kouření negativně ovlivňuje chemotaxi, fagocytózu i proces oxidativního vzplanutí neutrofilů (Selby a spol. 1992, Pabst a spol. 1995). Kouření ovlivňuje také specifickou imunitu. U kuřáků byla zjištěna signifikantně nižší proliferace T lymfocytů po mitogenní i bakteriální stimulaci (Sopori a spol. 1994, Chang a spol. 1990). U kuřáků byly také prokázány nižší hladiny IgG než u nekuřáků (Quinn a spol. 1996).

Těžší formy parodontitidy se 5-7 krát častěji objevují u těžkých kuřáků, než u nekuřáků (Kinane a Chestnutt, 2000). Jak konzervativní, tak chirurgická léčba je u kuřáků méně úspěšná než u nekuřáků. Bergström a spol. (2000) zjistili v průběhu desetileté studie signifikantně vyšší počet postižených lokalit a signifikantně vyšší ztrátu kostní hmoty u kuřáků než u nekuřáků a u lidí, kteří přestali kouřit v průběhu studie. Zvýšený úbytek alveolární kosti u kuřáků byl zaznamenán také v práci Chen a spol. (2001). Pokud pacient přestane kouřit, pak dochází postupně jak k upravení imunitních mechanismů, tak ke zlepšení stavu parodontu (Palmer a spol. 2005).

4.2.4. *Hygiena dutiny ústní*

Rozvoj onemocnění závisí na kvalitě péče o chrup. Bylo prokázáno, že pokud se neodstraňuje zubní plak z povrchu zubů, pak se během sedmi až devíti dnů mohou objevit první znaky zánětu dásní (Löe a spol. 1965). Po odstranění zubního plaku a obnovení péče o chrup zánět zpravidla během tří dnů ustoupí. Epidemiologické studie, prováděné v zemích třetího světa, však ukazují, že snížená ústní hygiena a nedostatečná stomatologická péče překvapivě nevedou k masivnímu rozvoji onemocnění parodontu u místních obyvatel. To je dáno pravděpodobně menší citlivostí těchto populací k rozvoji onemocnění parodontu (Löe a spol. 1986, Baelum a spol. 1988).

Kvalitní péče o chrup má velmi vysoký význam. Pokud je zajištěna, pak může být stav parodontu i ve vysokém věku velmi uspokojivý (Borrell a Papapanou 2005).

4.2.5. *Patogenní bakterie*

4.2.5.1. Složení mikroflóry dutiny ústní

Na povrchu zubů se usazuje měkký povlak (zubní plak), který obsahuje velké množství mikroorganismů. Socransky a spol. (1965) zjistili, že 1g zubního povlaku obsahuje $1,7 \times 10^{11}$ bakterií. V zubním plaku lidí bylo detekováno 300 - 400 různých druhů bakterií, ale pouze 10 - 20 druhů hraje významnou roli v destrukci parodontu (Zambon a Tempro 1995). Většina druhů bakterií zubního povlaku vyžaduje natolik specifické podmínky ke svému růstu, že je není možné kultivovat v běžných laboratorních podmínkách a byly tudíž detekované až po zavedení molekulárně biologických metod (Hugenholtz a spol. 2002).

Mikroorganismy vytvářejí na povrchu zubů organizovanou strukturu, která se nazývá mikrobiální **biofilm** (Costerton a spol. 1994). Tato struktura je výsledkem vzájemných interakcí mezi různými bakteriálními druhy. Bakterie na sebe nasedají a vytvářejí komplikovaná společenství spojená extracelulárními látkami, které jsou buď vytvářeny samotnými bakteriemi a nebo jsou výsledkem fyziologických funkcí hostitele. V biofilmu existuje také primitivní cirkulační systém zajišťující přísun živin a odvod zplodin. Biofilm je mnohem odolnější vůči působení imunitního systému a antibiotik než jednotlivé bakterie a zároveň představuje pro organismus dlouhodobý zdroj antigenních podnětů.

Tabulka č. 2 - Mikroorganismy asociované s patogenezí parodontitidy (Rose a Mealey 2004)

		Socransky a spol. (1998)
Early Colonizers		
Blue Complex:		charakterizovali jednotlivá
Various <i>Actinomyces</i> species	G ⁺ , nonmotile	společenství bakterií, která se společně
Purple Complex:		vyskytují v sulku resp. parodontálním
<i>Veillonella parvula</i>	G ⁻ , nonmotile	chobotu. Autoři zjistili, že spektrum
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	G ⁻ , nonmotile	bakterií zastoupených
Green Complex:		v parodontálních chobotech se liší
<i>Eikenella corrodens</i>	G ⁻ , nonmotile	v závislosti na hloubce parodontálních
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	G ⁻ , nonmotile	chobotů a stupni zánětu (Zambon a
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	G ⁻ , nonmotile	Tempo 1995, Socransky a spol.
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	G ⁻ , nonmotile	1998). Ve zdravých lokalitách se
<i>Capnocytophaga concisus</i>	G ⁻ , nonmotile	vyskytovaly bakterie modrého
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i> (serotype a) ^{††}	G ⁻ , nonmotile	komplexu (Tab. č. 2). Pro počáteční
<i>Streptococcus mitis</i>	G ⁻ , nonmotile	fáze gingivitidy bylo charakteristické
<i>Streptococcus oralis</i>	G ⁻ , nonmotile	nahromadění bakterií komplexu
<i>Streptococcus sanguis</i>	G ⁻ , nonmotile	zeleného a žlutého, z nichž
<i>Streptococcus gordonii</i>	G ⁻ , nonmotile	nejvýznamnější bakterií byl
<i>Streptococcus intermedius</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	<i>Actinobacillus</i>
Late Colonizers		<i>actinomycescomitans</i> , považovaný
<i>Campylobacter gracilis</i>	G ⁻ , motile	za suspektní patogenní bakterii u
<i>Campylobacter rectus</i> ^{††}	G ⁻ , motile	pacientů s časnou parodontitidou.
<i>Campylobacter showae</i>	G ⁻ , motile	S rostoucí hloubkou chobotu se
<i>Eubacterium nodatum</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	vytvářejí příznivé podmínky pro růst anaerobních a striktně anaerobních bakterií komplexu
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , subsp. <i>nucleatum</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	oranžového a červeného, považovaných za hlavní patogenní bakterie. <i>Tannerella forsythia</i> a
<i>Fusobacterium nucleatum</i> , subsp. <i>polymorphum</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	<i>P. gingivalis</i> patří mezi parodontální patogeny, kdežto ostatní bakterie jsou zvažovány jako
<i>Prevotella intermedia</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	potencionální parodontální patogeny (Consensus report 1996, Socransky a spol. 1998). Vyšší
<i>Peptostreptococcus micros</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	koncentrace bakterií červeného komplexu byla zjištěna u kuřáků než u nekuřáků (Zambon a
<i>Prevotella nigrescens</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	spol. 1996). Signifikantně vyšší koncentrace těchto bakterií byla také detekována v hlubokých
<i>Streptococcus constellatus</i>	G ⁺ , nonmotile	parodontálních chobotech u pacientů s IL-1 rizikovým genotypem než u pacientů bez IL-1
Red Complex.		kombinovaného genotypu (Socransky a spol. 2000).
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ^{††}	G ⁻ , nonmotile	
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>) ^{††}	G ⁻ , nonmotile	
<i>Treponema denticola</i> ^{††}	NA, motile	

Data from Reference 106.

^{††} Putative periodontal pathogens.

G⁺, Gram-positive; G⁻, Gram-negative; NA, not applicable.

4.2.5.2. Složky bakterií ovlivňující imunitní odpověď

Grampozitivní i gramnegativní bakterie obsahují množství strukturních i sekrečních komponent, které buď přímo poškozují tkáň parodontu, nebo stimulují imunitní systém hostitele. Imunitní odpověď, která je namířená proti infekci, však zároveň vede k další destrukci tkáň (Madianos a spol. 2005).

Virulentními faktory rozumíme mechanismy či molekuly, které patogenním mikroorganismům umožňují osídlit cílovou tkáň a vyvolat onemocnění (Socransky a Haffajee 1991). Mezi virulentní faktory řadíme faktory umožňující invazi bakterií, části bakteriálních buněčných stěn, exotoxiny a enzymy.

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je tvořena peptidoglykany, polysacharidy, proteiny, lipidy, lipopolysacharidy a lipoproteiny (Madianos a spol. 2005). Grampozitivní bakterie v buněčné stěně obsahují peptidoglykany, kyselinu teichoovou a polysacharidy. Řada z těchto molekul obsahuje konzervovanou sekvenci, která se nazývá PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern). Tato sekvence je rozpoznávána buňkami imunitního systému prostřednictvím povrchových receptorů (Pattern Recognition Receptors, PRR). Tyto receptory rozeznávají stejné bakteriální komponenty produkované různými druhy bakterií. PAMP na rozdíl od virulentních faktorů nebyly primárně vyvinuty k interakci s imunitním systémem hostitele, ale slouží k zajištění základních fyziologických potřeb bakterií.

Lipopolysacharid (LPS) - endotoxin

LPS je přítomný v buněčné stěně gramnegativních bakterií. Imunomodulační účinky jsou připisovány zejména jeho složce nazvané lipid A, který je tvořen z diglykózaminové kostry s estericky nebo amidicky navázanými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem zodpovědnými za vazbu na receptorové molekuly (Madianos a spol. 2005). LPS ovlivňují imunitní reakci prostřednictvím vazby na toll-like receptor (TLR)-4 (LPS z *E. coli* a *A. a.*) nebo TLR-2 receptor (LPS z *P. gingivalis*). Po stimulaci LPS dochází k produkci zánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, IP-10), chemokinů - macrophage chemoattractant protein (MCP)-5, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , prostaglandinu PGE₂ a NO (Shapira a spol. 1998, Hirschfeld a spol. 2001). LPS z *A. a.* významně zvyšuje expresi β_2 integrinů a L-selektinů na granulocytech a monocytech (Blix a spol. 1999). LPS stimuluje prostřednictvím vazby na TLR-4 receptor také expresi kostimulačních molekul CD80/CD86 a molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC)-II, které jsou důležité v aktivaci T buněk (Medzhitov 2001). LPS také aktivují komplementový systém.

Peptidoglykany (PGN)

Rigidní kostru všech stěn bakterií tvoří peptidoglykan (Madianos a spol. 2005). Zvláště mohutná je peptidoglykanová vrstva u grampozitivních bakterií, kde je peptidoglykan kovalentně vázán s kyselinou lipoteichoovou. Gramnegativní bakterie obsahují pouze tenkou peptidoglykanovou síť v periplazmatickém prostoru. PGN aktivují buňky vazbou na TLR-2 receptor, jsou rozpoznávány komplementem a dalšími specifickými receptory. PGN aktivují produkci TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 a MIP-1 α (Mattsson a spol. 1993, Wang a spol. 2000). PGN zvyšují produkci NO v makrofázích (Kenhartharan a spol. 1998). PGN však nejsou tak silným stimulem imunitní reakce jako LPS.

Proteázy

Proteázy jsou enzymy štěpící proteiny. Jsou produkovány řadou bakterií a jsou klasifikovány na základě jejich katalytické funkce. Nejvíce prostudované proteázy v souvislosti s parodontitidou jsou arginin-gingipain (Rgp) a lysin-gingipain (Kgp) proteázy. Jsou to cysteinové proteázy, produkované *P. gingivalis*, které štěpí proteiny za argininem resp. lysinem. Primárním cílem štěpení je získat peptidy a aminokyseliny potřebné k přežití bakterie. Tyto proteázy však také štěpí řadu důležitých molekul na povrchu buněk nebo v jeho okolí a tím chrání *P. gingivalis* před imunitní reakcí. Proteázy štěpí IL-8, IL-1 β či IL-6 (Zhang a spol. 1999, Fletcher a spol. 1997), štěpí také povrchové molekuly ICAM –1 (intracellular adhesion molecule) na epitelových buňkách (Tada a spol. 2003) a CD14 a LBP (lipopolysaccharide binding protein) molekuly na povrchu monocytů a fibroblastů (Tada a spol. 2002). Proteázy rovněž štěpí složky komplementu a degradují imunoglobuliny (Sundqvist a spol. 1985). Gingipains štěpí též C5a receptor na povrchu neutrofilů (Jagels a spol. 1996). Ve zdravé tkáni existují faktory inhibující proteolýzu. Při poruše těchto mechanismů dochází ke vzniku edémů, k infiltraci neutrofilů a k rozvoji patologických procesů (Travis a spol. 1997).

Heat-shock proteiny (HSP)

Eukaryotické a prokaryotické buňky reagují na stresové podmínky produkcí specifických stresových proteinů, které zahrnují i HSP. Tyto proteiny mají velmi konzervativní strukturu a jsou rozděleny do skupin na základě molekulové hmotnosti. Některé HSP fungují jako molekulové chaperony a podílejí se tak na sestavování bílkovin. Jiné se podílejí na procesech nitrobuněčného zpracování a degradace bílkovin a jejich nitrobuněčném transportu. Za nejvýznamnější jsou považovány HSP o m. h. 60 kDa (GroEL), které se

uplatňují na sestavování multimerních bílkovinných komplexů a HSP o m. h. 70 kDa (DnaK), které se podílejí na proteinových interakcích a transportu bílkovin přes membrány.

HSP stimulují zánětlivou imunitní reakci prostřednictvím vazby na CD14/TLR-4 (Ueki a spol. 2002). Bakterie však zároveň stimulují tvorbu lidského HSP 60 v tkáni, který naopak stimuluje makrofágy a další buňky k tvorbě prozánětlivých cytokinů.

HSP po navázání na specifické protilátky tvoří imunokomplexy (Tabeta a spol. 2000). Podobnost ve struktuře bakteriálních a lidských HSP může vést k rozvoji autoimunitní reakce v tkáni parodontu (Goulhen a spol. 2003).

Formyl-methionyl peptidy (fMLP)

Molekula fMLP vzniká odštěpením koncové části proteinů. Má velmi silný chemotaktický účinek na neutrofile a monocyty (Panaro a Mitolo 1999). Také zvyšuje expresi molekul CD11a, CD11b a CD18 nutných k adhezi granulocytů na endotel, k jejich diapedéze a migraci (Volz 1993).

Toxiny

Nejvíce prostudovaný toxin produkováný bakteriemi přítomnými v parodontu je leukotoxin LtxA z *A. a.* (Lally a spol. 1997). Ten se váže na lidské lymfoidní a myeloidní buňky prostřednictvím vazby s LFA-1 (lymfocyte function – associated antigen). Ve vysoké koncentraci způsobuje lýzu či apoptózu neutrofilů, monocytů a T buněk (Mangan a spol. 1991, Taichman a spol. 1991). CDT (cytolethal toxin) toxiny způsobují zastavení buněčného cyklu v G2 fázi a tím blokují proliferaci buněk. Mohou také modulovat imunitní reakci stimulací produkce některých cytokinů (Akifuz a spol. 2001).

4.2.5.3. Význam patogenních bakterií v patogenezi parodontitidy

Virulentní faktory patogenních bakterií ovlivňují funkci řady buněk. Jejich význam potvrzují *in vitro* studie na myších a krysích modelech. Snížená imunitní odpověď a destrukce kosti byla zjištěna signifikantně více u TLR-deficitních myších než u konvenčních myší po aplikaci *P. intermedia* a *F. nucleatum* (Hou a spol. 2000). U myšího modelu experimentální parodontitidy vedlo podání anti-CD14 protilátek před aplikací bakterií k poklesu produkce IL-6 a ke snížené resorpci alveolární kosti (Wang a spol. 2002).

Klony patogenních bakterií se navzájem liší svojí virulencí. Například bakterie *P. gingivalis* bylo detekováno více než 50 různých klonů (Ali a spol. 1997) a *A. a.* bylo detekováno více než 95 různých klonů (Asikainen a spol. 1996). Zdaleka ne všechny tyto

klony jsou však skutečně patogenní z hlediska rozvoje parodontitidy. Tím se vysvětluje fakt, že tyto bakterie se často vyskytují i ve zdravých lokalitách nebo u jedinců se zdravým parodontem (Haffajee a Socransky 1994).

Patogenní klony bakterií se přenášejí mezi členy rodiny (Petit a spol. 1993, Saarela a spol. 1993, Okada a spol. 2004) nebo může při změně podmínek v parodontu dojít k namnožení již zde přítomného ale dosud latentního patogenního klonu bakterií (Barua a spol. 1990, McKee a spol. 1986).

4.3. Systémová onemocnění, která vedou k rozvoji parodontitidy

4.3.1. Systémová onemocnění spojená s poruchou funkce neutrofilních granulocytů

Systémová onemocnění, při nichž dochází k funkčním poruchám neutrofilních granulocytů, jako jsou např. Chediakov - Higashiho syndrom, Downův syndrom, Papillonův - Lefèvreův syndrom a LAD syndrom, negativně ovlivňují stav parodontu (American Academy of Periodontology, 1996). Jejich patogeneze je popsána v kapitole o genetické zátěži.

4.3.2. Diabetes mellitus - cukrovka

Diabetes mellitus I. typu byl označován jako diabetes závislý na inzulínu (IDDM). U IDDM pacientů dochází k destrukci β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, která je způsobená autoimunitní reakcí zprostředkovanou zejména T buňkami, makrofágy a B buňkami (Krejsek a Kopecký 2004).

Pacienti s diabetem mellitus mají signifikantně vyšší prevalenci onemocnění parodontu než pacienti bez diabetu (17,3 % versus 9 %) (Soskolne a Klinger 2001). U pacientů s diabetem byly zjištěny změny v cévním řečišti, dochází k poruše funkce polymorfonukleárních leukocytů a také k abnormální syntéze kolagenu (Oliver a Tervonen 1994, Cutler a spol. 1991).

Mladí pacienti s IDDM vykazují mnohem vyšší procento gingivitidy a hlubší parodontální choboty než pacienti bez IDDM (Sepalla a spol. 1994, Shlossman a spol. 1990). Důležitou roli hraje i úspěšnost a délka léčby diabetu. Parodontitida progreduje více u pacientů, kteří hůře odpovídají na léčbu diabetu (Christgau a spol. 1998). Chronická parodontitida zvyšuje riziko rozvoje také diabetu II. typu (Mealey a Rethman 2003).

4.3.3. HIV onemocnění

Virus HIV (Human immunodeficiency virus) je původcem syndromu získané imunitní nedostatečnosti AIDS (Acquired ImmunoDeficiency Symdrom). Povrchový glykoprotein gp120 HIV viru se váže prostřednictvím CD4 molekuly na T buňky a nebo prostřednictvím receptorů pro chemokiny C-CR-2, C-CR3 a C-CR-5 na makrofágy. Vazbou na receptory se spustí kaskáda reakcí vedoucí k fúzi HIV virionu s buňkou. V infikované buňce dojde k namnožení viru a virové částice jsou následně uvolňovány do okolí pučením (Krejsek a Kopecký 2004).

HIV virus je přenášen tělními tekutinami. Po infekci HIV virem dochází k rozvoji tzv. primární infekce HIV, která je provázená horečkou, únavou, bolestí kloubů a svalů. Následuje dlouhé tzv. bezpříznakové období. Poslední fází je stádium AIDS. Mezi první příznaky nástupu AIDS patří kandidózy úst a jícnu, zároveň dochází u mnoha pacientů k rozvoji maligního onemocnění Kaposiho sarkomu, který postihuje kůži, ale též sliznice a může se projevit v dutině ústní.

Ačkoliv se původně předpokládalo, že pacienti HIV pozitivní mají zvýšené riziko rozvoje parodontitidy (Robinson 1992; American Academy of Periodontology 1996), v současné době se od tohoto názoru upouští (Heitz – Mayfield 2005, Smith a spol. 1995). Větší riziko představuje pro tyto pacienty léčba imunosupresivními léky, po které dochází k rychlejšímu rozvoji parodontitidy. Pacienti léčení vyššími dávkami léků vykazují šestkrát častější výskyt CAL > 3 mm v průběhu 20 měsíců než pacienti léčení nižšími dávkami léků (Barr a spol. 1992). Rychlejší postup parodontitidy je patrný u věkově starších pacientů s HIV. Nekrotizující ulcerativní parodontitida postihuje 4-6 % HIV pacientů (Glick a spol. 1994).

4.3.4. Osteoporóza

Osteoporóza je onemocnění charakterizované ztrátou kostní hmoty. Je typické zejména pro starší ženy v menopauze. Vazba mezi parodontitidou a osteoporózou je stále nejasná. Některé studie zjistily vyšší procento výskytu parodontitidy u pacientů s osteoporózou (Ronderos a spol. 2000, Tezal a spol. 2000), jiné tyto výsledky nepotvrdily (Lundström a spol. 2001). Payne a spol. (1999) zjistili u žen se sníženou hladinou estrogenů zvýšenou ztrátu alveolární kosti, avšak Reinhardt a spol. (1999) v průběhu dvouleté studie nezjistil rozdíly v úbytku alveolární kosti mezi pacientkami s osteoporózou a bez ní.

4.3.5. Parodontitida jako rizikový faktor pro rozvoj systémových onemocnění

Parodontitida představuje závažné riziko pro rozvoj dalších systémových onemocnění (Renvert 2003). Pacienti s těžkou parodontitidou mají zvýšené riziko rozvoje aterosklerózy, infekce myokardu a mozkové příhody (De Stefano a spol. 1993). Parodontitida je rovněž asociována s plicními infekcemi (Renvert 2003). Rozvinutá parodontitida u těhotných žen může způsobit předčasný porod (Oettinger a spol. 2005, Konopka 2004), případně negativně ovlivnit porodní hmotnost dítěte (Dasanayake a spol. 1998).

4.3.5.1. Parodontitida jako rizikový faktor rozvoje aterosklerózy

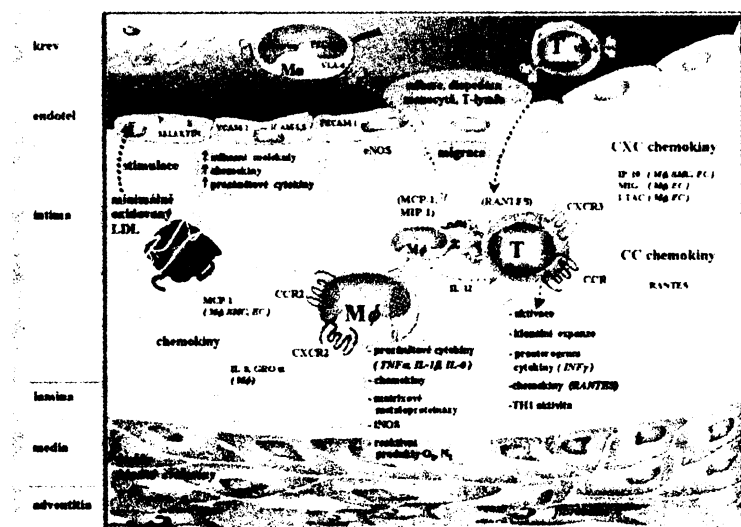
4.3.5.1.1. Vznik a rozvoj aterosklerózy

Ateroskleróza je považována za chronický zánět v cévním systému, který je výsledkem interakcí mezi chemicky modifikovanými lipoproteiny a buňkami imunitního systému (Krejsek a Kopecký 2004).

Časně stádium aterosklerózy je charakterizováno ukládáním lipidových proužků v endotelu velkých artérií. Lipidy jsou z potravy transportovány ve vazbě na lipoproteiny, zejména na částice LDL (low density lipoprotein). Zdravá endotelová výstelka je pro LDL nepropustná, je-li však mírně narušená, například v místech větvení cévního řečiště, stává se propustnou pro průchod LDL. Součástí LDL je apolipoprotein B (ApoB), který se váže na proteoglykany přítomné v mezibuněčné hmotě. Tím dochází k akumulaci LDL v tkáni a

zároveň k oxidaci LDL (ox-LDL). V těchto místech se hromadí také lipoprotein A, obsahující apolipoprotein A (ApoA), který má mimořádně silný proaterogenní účinek a ovlivňuje i proces fibrinolýzy spolu s růstem svaloviny.

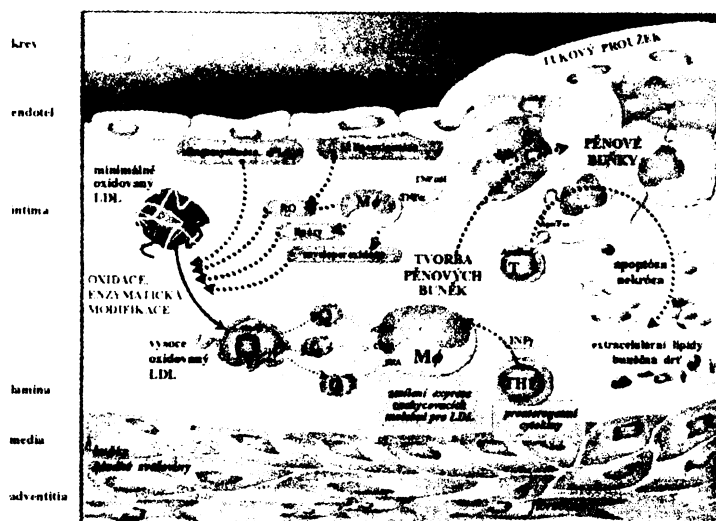
Chemicky modifikované LDL se účinně váží na vychytávací („scavenger“) receptory monocytomakrofágových buněk (Obr. č. 4).



Obrázek č. 4 – Aktivace imunitní reakce v intimě cév (Krejsek a Kopecký 2004)

Makrofágy, které hromadí v cytoplasmě velké množství lipidických komponent, se přeměňují na tzv. pěnové buňky. Tyto buňky se akumulují ve stěně arterií a vytvářejí tzv. lipidový proužek.

V pokročilých stádiích aterosklerotického procesu se vytváří tzv. aterosklerotický plát (Obr. č. 5). Ten je výsledkem interakcí buněčných a nebuněčných složek. Zahrnuje aktivitu T lymfocytů a makrofágů, která je odpovědná za migraci buněk hladké svaloviny a angiogenetické procesy dávající vznik mikrovaskulatuře. T lymfocyty stimulují B lymfocyty k tvorbě protilátek proti ox-LDL.



Obrázek č. 5 – Tvorba pěnových buněk
(Krejsek a Kopecký 2004)

Pěnové buňky prodělávají apoptózu a nekrózu. Plně vyvinutý aterosklerotický plát je charakterizován fibrotickou čepičkou a velkým jádrem, které je bohaté na extracelulární lipidické složky. V pozdních fázích vývoje aterosklerotického plátu dochází k jeho kalcifikaci. Plně vyvinutý aterosklerotický plát je nestabilní v důsledku rozsáhlé nekrózy a narušení mezibuněčné hmoty.

Porušením mikro-vaskulatury dochází ke krvácení. Buňky hladké svaloviny přitom hynou apoptózou, což zeslabuje fibrotický kryt aterosklerotické léze. Ruptura aterosklerotického plátu je příčinou odhalení vnitřních struktur arteriální stěny, které má za následek start prokoagulačních procesů vrcholících vznikem trombu.

Většina aterosklerotických plátů u nemocných s koronární arteriální nemocí zůstává po dlouhá léta stabilní. Stabilní plát zužuje arteriální lumen, což vede k projevům ischemie a myokardiální angíny během fyzické zátěže. Vznik akutního trombu může vést k život ohrožujícím koronárním stavům - infarktu myokardu, mozkové příhodě či k obliterativnímu cévnímu onemocnění, které postihuje periferní vaskulární systém a může vést až k amputacím končetin. Infarkt myokardu je první a mozková příhoda třetí nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých zemích (AHA 2003).

4.3.5.1.2. Význam apolipoproteinů E a B v metabolismu tuků

Lipoproteiny jsou sférické makromolekulární komplexy lipidů a apolipoproteinů (Vodrážka 1992). Triacylglyceroly a cholesterolestery tvoří jejich lipofilní jádro, které obaluje bílkovinná složka, fosfolipidy a neesterifikovaný cholesterol. Plasmové lipoproteiny zajišťují transport a distribuci lipidů (vstřebaných lipidů potravy, lipidových hormonů a v tucích rozpustných vitaminů) prostřednictvím krve a lymfatického systému. Fungují též jako regulátory metabolismu tuků.

Plasmové lipoproteiny lze rozdělit pomocí ultracentrifugace v hustotním gradientu. Chylomikrony jsou největší lipoproteiny (Brunzell a Failor 2005). Jejich převážnou část tvoří triacylglyceroly a estery cholesterolu. Vznikají v tenkém střevě, odkud se obrácenou pinocytózou dostávají do krve a lymfy. Jsou dopraveny do jater, kde se dále rozkládají nebo resyntetizují. Velká množství triacylglycerolů a cholesterylesterů obsahují i VLDL (Very-low density lipoproteiny) tvořící se také v tenkém střevě. Štěpením VLDL vznikají IDL (Intermediate-density lipoproteiny) a LDL (Low density lipoproteiny), které se podílejí zejména na transportu a ukládání volného cholesterolu do tkání. HDL (High-density lipoprotein) se podílí na transportu cholesterolu a lipoproteinů zpět z tkání do jater.

Strukturní součástí lipoproteinů jsou apolipoproteiny. Podílejí se na transportu lipidů, napomáhají sestavení makromolekulárního komplexu, slouží jako ligandy pro specifické receptory a jako regulační kofaktory (Brunzell a Failor 2005). Apolipoprotein E je nezbytný při tvorbě chylomikronů a VLDL a prostřednictvím jeho vazby na LDL receptor na povrchu hepatocytů dochází k vychytávání a následnému štěpení VLDL na LDL (Eichner a spol. 2002). Existují tři alely pro apolipoprotein E: *apo ε2*, *apo ε3* a *apo ε4*. Apolipoprotein E4 má nejvyšší afinitu k receptoru pro LDL, následuje Apo E3 a Apo E2 s nejnižší afinitou. Nejčastěji se v populaci vyskytuje *apo ε3* (95 % bělošské populace), poté *apo ε4* (27 %) a *apo ε2* (16 %) (Mahley a Huang, 1999).

U pacientů *apo ε2+* dochází k rozvoji hyperlipidémie III charakterizované vysokou koncentrací triglyceridů, cholesterolu a VLDL v plazmě a současně sníženou koncentrací LDL (Brunzell a Failor 2005). Civeira a spol. (1996) zjistili, že sice 94,4 % pacientů s hyperlipidémií je homozygotních v *apo ε2*. Zároveň však zjistili, že na rozvoji tohoto onemocnění se musí podílet i další geny, neboť pouze u 2 % osob homozygotních v *apo ε2* dochází k rozvoji hyperlipoproteinémie III.

Přítomnost apolipoproteinu Apo E4 zvyšuje rychlost v metabolismu tuků, a tím dochází ke zvýšené koncentraci cholesterolu a triglyceridů v séru osob *apo ε4+* (Stengard a spol. 1995). U pacientů s koronárním onemocněním byla zjištěna signifikantně vyšší frekvence

homozygotních i heterozygotních apo $\epsilon 4$ alel (Wang a spol. 2004). Apolipoprotein Apo E4 je však rizikovým zejména z hlediska rozvoje Alzheimerovy choroby (Blacker a Tanzi, 1998). Homozygotní kombinace apo $\epsilon 4$ se vyskytuje u 12-15 % pacientů s Alzheimerovou chorobou, ale pouze u 1-3 % zdravých kontrolních osob. U osob ve věku 65 let zvyšuje přítomnost homozygotní apo $\epsilon 4$ pravděpodobnost vzniku Alzheimerovy choroby na 30 %, naopak absence rizikové alely snižuje pravděpodobnost vzniku Alzheimerovy choroby na 9 % (Seshadri a spol. 1995). Apo E4 selektivně ovlivňuje funkci cholinové acetyltransferázy, a tím pravděpodobně způsobuje neuropatologické změny u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Lai a spol. 2006).

Apo B-100 je součástí LDL a zprostředkovává vazbu těchto částic na receptor pro LDL. Apolipoprotein B-100 se vyskytuje ve třech formách Arg3500Gln, Arg3531Cys a Arg3500Trp. Mutace apo B-100 Arg3500Gln má nižší afinitu k LDL receptoru, což vede k zvýšení koncentrace lipidů a lipoproteinů v krvi (Brunzell a Failor 2005). U těchto pacientů dochází k rozvoji hypercholesterolemie a aterosklerózy. Tato mutace je velmi vzácná, v bělošské populaci se vyskytuje v heterozygotní formě ve frekvenci 1:500 až 1:700, u pacientů s těžkými metabolickými poruchami se vyskytuje ve frekvenci 1:100. Homozygotní výskyt je extrémně vzácný.

4.3.5.1.3. Onemocnění parodontu a ateroskleróza

V posledních dvaceti letech se intenzivně studuje vztah mezi stavem parodontu (resp. přítomností patogenních bakterií v dutině ústní) a rozvojem aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění (Meurman a spol. 2004). Pro obě onemocnění jsou společné obecné rizikové faktory jako jsou kouření, obezita a diabetes (Armitage 2000). Z dlouhodobých studií vyplývá, že u pacientů s parodontitidou je 20 - 25 % riziko vzniku infarktu myokardu (De Stefano 1993, Janket a spol. 2003) a 17 % riziko vzniku mozkové příhody (Morrison a spol. 1999). Otázkou ovšem zůstává, zda parodontitida je příčinou či následkem aterosklerózy (Haynes a Stanford 2003).

Na počátku změn vedoucích k tvorbě aterosklerotických plátů je poškození endotelu (Meurman a spol. 2004) a také přítomnost patogenních bakterií a virů (*Cytomegalovirus*, *Chlamydie pneumoniae*, *Helicobacter pylori*). Infekce působí také na koagulační kaskádu a způsobuje změny v metabolismu lipidů. Podobně se uplatňují bakterie zubního plaku. Chiu (1999) potvrdil přítomnost bakterií *P. gingivalis* a *Streptococcus sanguis* v aterosklerotických plátech ve vzorcích cév odebraných při chirurgické rekonstrukci cévního řečiště. Pomocí PCR reakce byly v aterosklerotických plátech detekovány také mikrobiální ribozomální RNA

(rRNA) a DNA bakterií *P. gingivalis*, *A. a.*, a *P. intermedia* (Haraszthy a spol. 2000, Taylor – Robinson a spol. 2002, Fiehn a spol. 2005, Ford a spol. 2005).

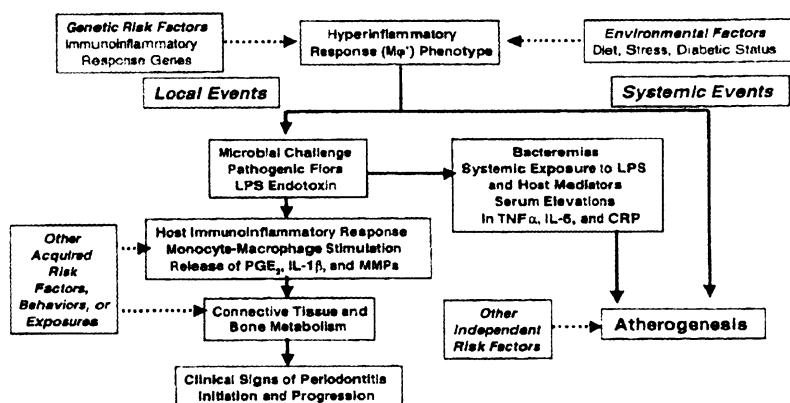
Vztah mezi *P. gingivalis* a aterosklerózou byl potvrzen také použitím experimentálního modelu. Lalla a spol. (2003) vyvolali u apo E-null myši rozvoj parodontitidy a aterosklerózy orální inokulací *P. gingivalis*. Během čtyř měsíců se u těchto myši vytvořily aterosklerotické proužky, v nichž byla detekována také přítomnost *P. gingivalis*. U myši s parodontitidou byly detekovány vyšší sérové hladiny IL-6 a zvýšená exprese VCAM-1 v aortě než u myši kontrolních.

V sérech pacientů s aterosklerózou byly detekovány signifikantně vyšší koncentrace protilátek proti *P. gingivalis*, proti GroEL a proti lidskému hHSP 60 než u zdravých osob (Choi a spol. 2004, Pussinen a spol. 2005). Hladiny protilátek klesaly po provedení konzervativní terapie a zlepšení stavu parodontu. Z periferní krve pacientů a ze vzorků aterosklerotických plátů byly izolované T buněčné klonů specifické k GroEL, hHSP 60 a *P. gingivalis*, které produkovaly jak Th1, tak Th2 cytokiny (Chung a spol. 2003, Ford a spol. 2005).

Zvýšené sérové hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) jsou rizikovým markerem u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Zvýšené hladiny CRP byly detekovány i v sérech pacientů s parodontitidou (Wu a spol. 2000b, D’Aiuto a spol. 2004) a korelovaly s přítomností bakterií *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *P. intermedia* v subgingiválním plaku pacientů s parodontitidou (Noack a spol. 2001). Ultrazvukovým vyšetřením byla u pacientů s parodontitidou prokázána signifikantní změna v propustnosti endotelu v porovnání se zdravými kontrolami (Mercanoglu a spol. 2004). Po zahájení léčby parodontitidy došlo i k upravení propustnosti endotelu.

Model podle Beck a spol. (1998) popisující vztah mezi parodontitidou a aterosklerózou

je uveden na Obr. č. 6. Předpokládá se, že u pacientů, kteří jsou postižení oběma typy onemocnění, dochází při styku s bakteriemi k hyperzánětlivé imunitní reakci. Ta je pravděpodobně dána genotypem těchto pacientů.



Obrázek č. 6 – Vztah mezi parodontitidou a aterosklerózou (Beck a spol. 1998)

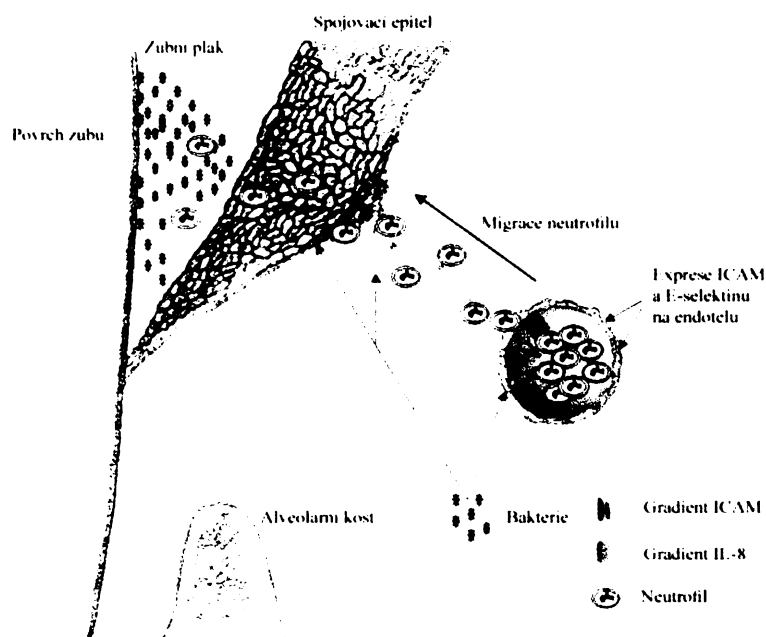
4.4. Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy

4.4.1. Mechanismy nespecifické imunity

Organismus reaguje na přítomnost bakterií zánětlivou imunitní reakcí. V počáteční fázi hrají hlavní roli složky nespecifické imunity. Úspěšná a účinná odpověď organismu na infekci je závislá na selektivním, ale ne příliš specifickém rozpoznávacím systému. Ten je založen především na rozpoznání chemických struktur přítomných na povrchu mnoha různých mikroorganismů, ale nepřítomných na povrchu buněk organismu vlastních. Po rozpoznání takovýchto cizorodých struktur se aktivují efektorové mechanismy buněk nespecifické imunity (makrofágy, neutrofilní granulocyty), ale i humorální systémy (např. komplement), které cizorodé mikroorganismy likvidují. Mechanismy nespecifické imunity umožňují neutralizaci a eliminaci také škodlivých produktů patogenních organismů a následně regeneraci poškozených tkání (Krejsek a Kopecký 2004).

U zdravého parodontu je odstraňování patogenních bakterií zajišťováno mechanicky: pohyby jazyka, žvýkáním potravy, produkcí slin, odlučováním epitelových buněk, a tvorbou sulkulární tekutiny, která vyplňuje gingivální sulkus (Niekrash 1985). Sulkulární tekutina má důležité postavení v obranných mechanismech, neboť obsahuje složky sérových proteinů a komplementu a je v ní přítomno značné množství polymorfonukleárních leukocytů. Složení sulkulární tekutiny se mění podle stupně zánětu. V oblasti sulku tvoří neutrofilův ochrannou bariéru mezi plakem a epitelem, která brání průchodu bakterií do epitelu a do níže položených tkání (Hammerle a Frank 1991).

Patogenní bakterie adherují na povrchu epitelu, pronikají do něj (Obr. č. 7) a přitom se uvolňují bakteriální produkty (LPS, PGN, proteázy, peptidy). Interakce s bakteriemi a jejich produkty stimuluje epitelové buňky k produkci prozánětlivých cyto-kinů



Obrázek č. 7 - Aktivace nespecifické imunity v tkáni parodontu (Dixon a spol. 2004)

IL-1 β , TNF- α , IL-6 a IL-8 (Madianos a spol. 2005). Bakteriální produkty v pojivových tkáních stimulují prostřednictvím TLR receptorů další buňky jako monocyty, makrofágy, fibroblasty a mastocyty k produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů (macrophage inflammatory protein MIP-1 α , MIP-2, monocyte chemoattractant protein MCP-1, MCP-5 a IL-8), prostaglandinu PGE₂, histaminu, leukotrienů a matrixových metaloproteináz. Zároveň dochází k aktivaci makrofágů, které začnou na svém povrchu exprimovat molekuly MHC-II a kostimulační molekuly B7. Přitom dendritické buňky pohlcují bakterie a putují do lymfatických uzlin, kde antigeny ve vazbě na MHC předkládají T-lymfocytům.

Působením složek bakterií (LPS, PGN) a zánětlivých mediátorů (IL-1 β , TNF- α a histaminu) dochází k aktivaci endotelových buněk. Zvýšení exprese ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule), P- a E-selektinů na buňkách endotelu umožňuje zachycení a průnik leukocytů do tkáně (Van Dyke a Champagne 1995). Po průniku migrují tyto buňky ve směru koncentračního gradientu chemotaktických látek produkovaných buňkami organismu (IL-8, MCP-1 atd.) nebo bakteriemi (fMLP, fimbrie atd.). Neutrofilní granulocyty fagocytují bakterie a jejich složky, naopak makrofágy fagocytují zejména poškozené nebo apoptické vlastní buňky organismu (Kornman a spol. 1997).

V průběhu reakce se uplatňují také složky komplementu. Působí jednak proti patogenním bakteriím, ale zároveň se podílejí na poškození tkáně (Schenkein a Genco 1977). Destruktivní účinek komplementu na tkáň spočívá buď v přímém odbourávání kolagenních vláken, proteoglykanů a hyaluronové kyseliny (Allison a spol. 1976) nebo nepřímém poškození tkáně aktivací cytotoxických T a B lymfocytů. U pacientů s juvenilní parodontitidou je komplement aktivován klasickou cestou, tj. prostřednictvím protilátky navázané na antigen (Niekrash 1985). U pacientů s gingivitidou a parodontitidou dospělých dochází k aktivaci komplementu alternativní cestou, tj. bez přítomnosti protilátek.

Produkce IL-1 β , TNF- α a IL-6 stimuluje také produkci proteinů akutní fáze, tj. LBP, sCD14, komplementových proteinů a C-reaktivního proteinu, které prohlubují zánětlivou reakci. Bakteriální antigeny aktivují fibroblasty a makrofágy k produkci plasminogen - aktivátoru (Page 1991). Tento enzym aktivuje řetězec reakcí, na jehož konci se vytvářejí aktivní metaloproteinázy, které degradují kolagenní vlákna a narušují tak integritu mezibuněčné hmoty. To umožňuje snazší průnik bakterií ze zubního plaku do tkáně. Výsledkem celého procesu je prohloubení zánětu a zvýšená produkce sulkulární tekutiny.

4.4.2. Mechanismy specifické imunity

Počáteční nespecifická imunitní reakce postupně přechází ve specifickou imunitní reakci. V tkáni parodontu jsou přítomny jak T, tak B lymfocyty (Gemmell a spol. 1992, Yamazaki a spol. 1993). Ve stabilních lézích převažují T lymfocyty, zatímco v aktivních lézích převládají B buňky a plazmatické buňky (Mackler a spol. 1977, Reinhardt a spol. 1988, Seymour a Greenspan 1979, Seymour a spol. 1993).

4.4.2.1. Antigen prezentující buňky

Pro specifickou aktivaci B a T lymfocytů je nezbytná přítomnost antigen prezentujících buněk (APC), které na svém povrchu předkládají antigeny ve vazbě na MHC molekuly a zároveň exprimují kostimulační molekuly, které poskytují T a B buňkám další nezbytné signály.

Dendritické buňky jsou profesionální APC, schopné aktivovat jak primární, tak sekundární imunitní odpověď (Steinman 1991). Imaturované dendritické buňky vznikají v kostní dřeni a poté migrují do periferních nelymfatických tkání. Po setkání s antigenem tento antigen zpracují, stanou se maturovanými dendritickými buňkami a migrují do lymfatických uzlin, kde předkládají antigen naivním T buňkám (Rescigno 1999). Imaturované dendritické buňky asociované s *P. gingivalis* byly detekovány imunohistochemicky v epitelu gingivy, maturované buňky se vyskytovaly pouze v pojivových tkáních (Cutler a spol. 1999).

Makrofágy a B buňky iniciují sekundární imunitní odpověď prostřednictvím exprese MHC II molekul (Nickoloff a Turka 1994). Makrofágy a dendritické buňky váží antigen relativně nespecificky, proto aktivují T lymfocyty v počátečních fázích zánětlivé reakce. B buňky váží antigen specificky, uplatňují se proto v pozdějších fázích zánětlivé reakce, avšak aktivují specifické T buňky a indukují jejich klonální expansi. Mezi buňky prezentující antigen v postižených tkáních parodontu patří též keratinocyty, epitelové buňky a fibroblasty (Gemmell a Seymour 2004).

Na povrchu monocytů, endotelových buněk, fibroblastů, osteoblastů i dendritických buněk jsou přítomny různé druhy toll-like receptorů (TLR), které se váží na různé molekuly přítomné na povrchu bakterií (Anderson 2000). TLR-2 váží lipoteichoovou kyselinu, lipoproteiny, fimbrie či peptidoglykany, TLR-3 reagují na přítomnost dvouvláknové RNA, TLR-9 váží DNA (Dixon a spol. 2004). Po vazbě antigenu na určitý typ TLR dochází k aktivaci signálních drah v závislosti na typu TLR (O'Neill 2002). LPS izolovaný z *E. coli* a *P. gingivalis* prostřednictvím vazby na TLR-4 aktivuje makrofágy k produkci IL-12 a IFN- γ ,

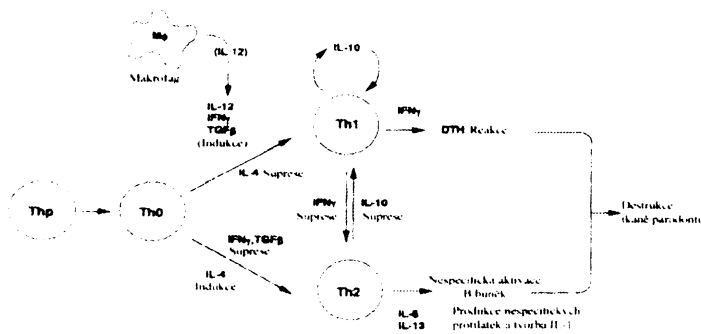
ale vazbou na TLR-2 naopak inhibuje transkripci IL-12 a tím tlumí Th1 imunitní reakci (Hirschfeld a spol. 2001).

Význam TLR-4 v patogenezi parodontitidy byl prokázán experimentálně použitím myši deficitních v genu pro TLR-4. Tyto myši měly po aplikaci patogenních bakterií na rozdíl od divokých kmenů myši signifikantně nižší destrukci alveolární kosti, která korelovala s nižšími hladinami prozánětlivých cytokinů IL-1 α , IL-1 β a IL-12 (Hou a spol. 2000).

4.4.2.2. T lymfocyty

Naivní T lymfocyt (tj. prekurzor Th nebo Tc buněk) potřebuje k dalšímu vývoji několik signálů. Na povrchu dendritické buňky musí T lymfocyt rozeznat antigen ve formě komplexu příslušného peptidu s MHC glykoproteinem pomocí TCR receptoru a musí dojít k aktivaci kostimulačních receptorů (CD28, některé adhezivní receptory, receptory pro cytokin). Výsledkem této reakce je buněčné dělení a diferenciaci na klon efektorových buněk buď typu Th nebo Tc (shrnutí v Hořejší 2000). Aktivované paměťové T buňky poté migrují do místa zánětu a zde po kontaktu s patřičným ligandem dochází ke spuštění efektorových funkcí (sekrece cytokinů u Th resp. uvolnění cytotoxických látek u Tc).

CD28 je hlavní kostimulační molekulou T lymfocytů, jejímiž ligandy jsou CD80 (B7-1) a CD86 (B7-2), které jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách (Allison 1994). Na aktivovaných T buňkách je exprimována molekula CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocytes associated protein, též CD152), homologní s CD28, která umožňuje naopak inhibovat T buněčnou odpověď (McCoy a Le Gros 1999). Tato molekula má na rozdíl CD28 vyšší afinitu a aviditu k B7. Pokud je přítomné omezené množství B7 na povrchu APC buněk, pak převažují signály přes CTLA-4 a dojde k inhibici T buňky. Je-li přítomno dostatečné množství B7 molekul, pak převáží signály přes CD28 a dojde k aktivaci T buňky. Th1 buňky jsou více závislé na koncentraci B7 molekul než Th2 buňky (Gause a spol. 1997). Pokud jsou APC buňky v tkáni B7 negativní, Th1 klony nejsou stimulovány k produkci IL-2 a výsledkem je snížení buněčně zprostředkované odpovědi (Jenkins a Johnson 1993). Th2 buňky sice potřebují aktivaci přes vazbu CD28 s B7, ale pouze k primární aktivaci. Poté jsou schopné produkovat IL-4 a k další aktivaci již stimulaci přes CD28 nepotřebují (Mc Arthur a Raulet 1993). Ta je nahrazena aktivací cytokinem IL-1.



Obrázek č. 8 – Th1 a Th2 imunitní reakce v patogenezi parodontitidy (Okada a Murakami 1998)

Imunitní odpověď v parodontu namířená proti infekci je regulována cytokiny produkovanými Th1 a Th2 buňkami (Obr. č. 8). Cytokiny IL-2 a IFN-gama, které jsou produkovány Th1 buňkami, jsou hlavním faktorem přítomným v časných lézích. IFN-gama zvyšuje fagocytární

aktivitu jak neutrofilů, tak makrofágů a tím kontroluje průnik infekce. Pokud je Th1 reakce nedostatečná, pak přetrvávající tvorba biofilmu vede k progresi léze (Gemmell a Seymour 2004) a k aktivaci B buněk. Aktivace mastocytů a následná produkce IL-4 zvyšuje Th2 odpověď, která stimuluje B buňky k produkci protilátek. Jsou-li tyto protilátky ochranné, potlačí infekci a dojde k zastavení onemocnění. Pokud jsou protilátky neúčinné, kontinuální aktivace B lymfocytů vede k produkci vysokých hladin IL-1, která podporuje destrukci tkáně (Gemmell a spol. 1997). Polyklonální aktivace B lymfocytů může vést také k produkci autoprotilátek, namířených např. proti kolagenu (Ftis a spol. 1986, Anusaksathien a spol. 1992).

Diferenciace T lymfocytů na Th1 a nebo Th2 je ovlivněna řadou faktorů zahrnujících cytokinové prostředí, dávku antigenu, druh antigen-prezentující buňky, délka stimulace a přítomnost kostimulačních molekul. Th1 a Th2 buňky se vzájemně regulují produkcí cytokinů. IFN- γ produkováný Th1 buňkami inhibuje růst Th2 buněk (Gajewski a Fitch 1988), naopak IL-4 a IL-10 inhibují aktivaci Th1 buněk (D'Andrea a spol. 1993).

Aktivované Th1 lymfocyty produkují IFN-gama, IL-2 a TNF- α (Krejsek a Kopecký 2004) a podporují buňkami zprostředkovanou cytotoxickou reakci (ADCC – Antigen dependent cellular cytotoxicity). IFN- γ je hlavním prozánětlivým cytokinem. Aktivuje makrofágy ke zvýšení fagocytózy, podporuje oxidativní vzplanutí a intracelulární zabíjení, zvyšuje expresi MHC-I a MHC-II molekul na povrchu APC buněk a stimuluje produkci TNF- α . IL-2 je cytokin nezbytný pro aktivaci a proliferaci T a B lymfocytů, stimuluje NK (Nature killer – přirození zabíječi) buňky a LAK buňky (Lymphokine-activated killer cells) a stimuluje tvorbu IFN- γ . TNF- α má pluripotentní prozánětlivý účinek, zesiluje aktivaci a proliferaci jak T, tak B buněk, indukuje expresi MHC-I a MHC-II molekul, adhezních molekul, stimuluje hematopoézu a indukuje apoptózu.

Aktivované Th2 buňky produkují IL-4, IL-5, IL-6 a IL-13 které jsou potřebné k diferenciaci B buněk na plazmatické buňky a k izotypovému přesmyku na IgG a IgE. Th2 buňky produkují také IL-10, který má silné protizánětlivé účinky – inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů, tlumí fagocytózu, oxidativní vzplanutí, intracelulární zabíjení.

Aktivované T lymfocyty však produkují mnohem větší spektrum cytokinů. Do roku 2004 bylo popsáno 22 cytokinů produkovaných T lymfocyty a pravděpodobně ještě nejsou odhaleny všechny (Yamazaki a Nakajima 2004). Cytokinová síť je velmi komplexní, například ke stimulaci produkce IFN- γ dochází v přítomnosti IL-12, IL-15 a IL-18, naopak k inhibici IFN- γ dochází v přítomnosti IL-4, IL-10, IL-11a IL-13. T buňky produkují také cytokiny, které se podílejí na destrukci tkáně IL-7, IL-17, IL-18, GM-CSF, TNF- α a RANKL. Imunoregulace těchto procesů není dosud přesně popsána.

4.4.2.2.1. Význam T lymfocytů v patogenezi onemocnění parodontu

Ivanyi a Lehner (1970) sledovali proliferaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pacientů s chronickou parodontitidou po stimulaci bakteriemi zubního plaku. Zjistili, že buňky pacientů s parodontitidou proliferovaly po stimulaci bakteriemi zubního plaku signifikantně více než buňky zdravých osob.

Patters a spol. (1980) použitím proliferačního testu zjistili, že pacienti s parodontitidou signifikantně reagují na stimulaci *P. gingivalis* oproti pacientům s gingivitidou. Přítomnost T lymfocytů specifických k *P. gingivalis* byla potvrzena použitím metody limitního ředění u pacientů s parodontitidou dospělých, s gingivitidou a u zdravých osob (Mahanonda a spol. 1989). Zároveň autoři prokázali, že po provedení konzervativní terapie klesá počet specifických T lymfocytů.

Ohyama a spol. (1998) analyzovali T-buněčné linie získané od pacientů s časnou parodontitidou. Autoři detekovali T buňky specificky rozpoznávajících antigen Ag53 izolovaný z *P. gingivalis*. Proliferace většiny T-buněčných linií byla inhibována přidáním anti-HLA-DRB1 protilátek, což potvrzuje, že imunitní reakce navozená po stimulaci Ag53 byla specifická, nikoliv polyklonální.

Klonální analýza T lymfocytů izolovaných z parodontální tkáně ukázala, že počet T buněčných klonů infiltrovaných v zasažené tkáni je relativně nízký. Yamazaki a spol. (2000) detekovali oligoklonální T buňky v tkáni, ale nikoliv v periferní krvi. Klonalita T buněk v periferní krvi může být ovlivněna *in vitro* stimulací patogenními bakteriemi (Nakajima a spol. 1998). Po stimulaci buněk izolovaných z periferní krve pacientů membránovým proteinem *P. gingivalis* došlo ke klonální aktivaci specifických T buněk.

Proces akumulace specifických T lymfocytů v infikované tkáni je ovlivněn zejména produkcí chemokinů a expresí chemokinových receptorů na povrchu T lymfocytů (Siveke a Hamann 1998). Garlet a spol. (2003) zjistili, že u pacientů s agresivní parodontitidou jsou exprimovány převážně CCR5 a CXCR3 asociované s Th1 buňkami, kdežto u pacientů s chronickou parodontitidou převažovala exprese CCR4, asociované s Th2 lymfocyty. Selektivní hromadění určitého typu buněk v tkáni vede k produkci určitého spektra cytokinů v tkáni a tím určuje progresi či stabilitu léze.

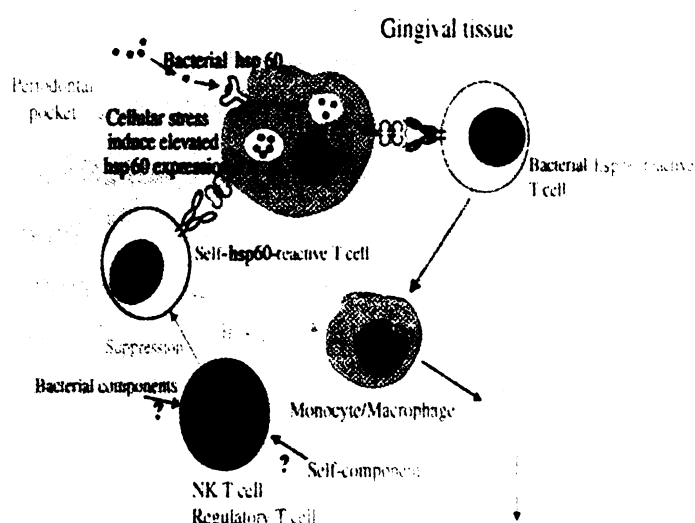
Snížené hladiny Th1 a naopak vyšší hladiny Th2 cytokinů byly detekovány v sulkulární tekutině (Pilon a spol. 1991) a po mitogenní či bakteriální stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z gingivy postižené parodontitidou nebo z periferní krve pacientů s parodontitidou (Fujihashi a spol. 1994). Také po *in vitro* bakteriální stimulaci buněk izolovaných z periferní krve pacientů byla zjištěna signifikantně vyšší tvorba Th2 cytokinů a signifikantně nižší tvorba Th1 cytokinů u pacientů s parodontálním onemocněním než u zdravých osob (Yamazaki a spol. 1994, Aoyagi a spol. 2000, Bártová a spol. 2000). Tyto studie podporovaly hypotézu, podle které byla progresse onemocnění parodontu asociována s Th2 imunitní reakcí, naopak stabilita onemocnění byla spjata s Th1 imunitní reakcí (Seymour a spol. 1993).

Avšak další práce tuto teorii nepotvrdily. Gemmell a spol. (1995) izolovali z tkáně parodontu pacientů s gingivitidou a parodontitidou T-buněčné linie specificky reagující s *P. gingivalis*. U všech buněčných linií byla detekována intracelulární tvorba IL-4 a IFN- γ , pouze některé linie tvořily také IL-10. Wassenaar a spol. (1995) izolovali buněčné linie z tkáně pacientů s parodontitidou. Osmdesát procent CD4+ buněk produkovalo vysoké hladiny IL-4 a nízké hladiny IFN- γ . Th2 klony reagovaly na stimulaci jak bakteriálními antigeny, tak kolagenem typu I. Yamazaki a spol. (1994) detekovali v tkáni parodontu pomocí imunohistologické analýzy použitím dvojího značení paměťové CD45RO+ T lymfocyty produkující jak IL-4 tak IL-6. Tyto buňky však tvořily pouze malé procento paměťových buněk. V další studii (Fujihashi a spol. 1994) byla u CD4+ buněk izolovaných z tkáně parodontu zjišťována exprese mRNA pro cytokiny. U většiny buněk byla detekována mRNA pro IFN-gama, IL-6 a IL-13, avšak pouze u jedné skupiny byla také detekována mRNA pro IL-10.

V současnosti tedy převládá názor, že v imunitní reakci namířené proti patogenním bakteriím se uplatňují obě subpopulace Th lymfocytů. K patologickým projevům dochází tehdy, pokud převládne buď Th1 nebo Th2 imunitní odpověď (Yamazaki a Nakajima 2004).

Resorpce alveolární kosti je primárně způsobená osteoklasty. K aktivaci osteoklastů dochází buď působením cytokinů IL-1, TNF- α a IL-6 (Kobayashi a spol. 2000) nebo prostřednictvím vazby mezi aktivovaným T lymfocytem a osteoklastem. Teng a spol. (2000) potvrdili význam CD4+ buněk v aktivaci osteoklastů použitím experimentálního modelu. Myším s vážným kombinovaným imunodeficitem transplantovali lymfocyty izolované z periferní krve pacientů s parodontitidou a zároveň jim podali *A. a.* Po aplikaci *A. a.* došlo k aktivaci T buněk a k lokální destrukci alveolární kosti. Zároveň byla zvýšena exprese OPGL (osteoprotegrin ligand) na CD4+ T buňkách. Po aplikaci solubilního OPG s následným podáním patogenních bakterií myším došlo k inhibici funkce OPGL, ke snížení resorpce alveolární kosti a k poklesu počtu osteoklastů. T lymfocyty přitom produkovaly smíšený Th1 a Th2 profil cytokinů (Teng 2002). Použitím imunodeficitních myší bylo zjištěno, že odstranění CD4+ buněk nebo absence IFN- γ či IL-6 cytokinů také vede ke snížení resorpce alveolární kosti (Baker a spol. 1999).

V patogenezi onemocnění hrají roli také cytotoxické (Tc) lymfocyty a NKT (nature killer T) buňky. Cytotoxické lymfocyty exprimují na svém povrchu CD8 molekulu. U pacientů s parodontitidou byly prokázány dvě subpopulace Tc buněk z nichž první subpopulace produkovala vysoké hladiny IFN- γ a vykazovala vysoký cytotoxický účinek, druhá subpopulace produkovala vysoké hladiny IL-4 a IL-5, neměla cytotoxický účinek, naopak inhibovala proliferaci Th1 buněk (Wassenaar a spol. 1996).



Obrázek č. 9 - Význam NKT buněk v regulaci autoimunitní reakce (Yamazaki a Nakajima 2004)

NKT (Nature killer T cells) buňky představují unikátní typ lymfocytů, který na svém povrchu exprimují jak CD161, tak TCR receptor s invariantním α řetězcem, který je asociován s β řetězcem určeným přednostně genem $V\beta_{11}$. Prostřednictvím TCR rozeznávají NKT buňky glykolipidové antigeny, které jsou prezentovány ve vazbě na CD1d molekulu (Berglundh a spol. 1998). Po stimulaci antigenem NKT buňky produkuje IL-4, IFN- γ , IL-10 a TGF- β , a tím ovlivňují jak Th1 tak Th2 lymfocyty (Obr. č. 9). Význam

NKT buněk byl studován v souvislosti s rozvojem autoimunitních onemocnění např. systémové sklerózy multiplex (Sumida a spol. 1995) a předpokládá se, že se mohou podílet na regulaci imunitní reakce také v tkáni parodontu (Yamazaki a Nakajima 2004).

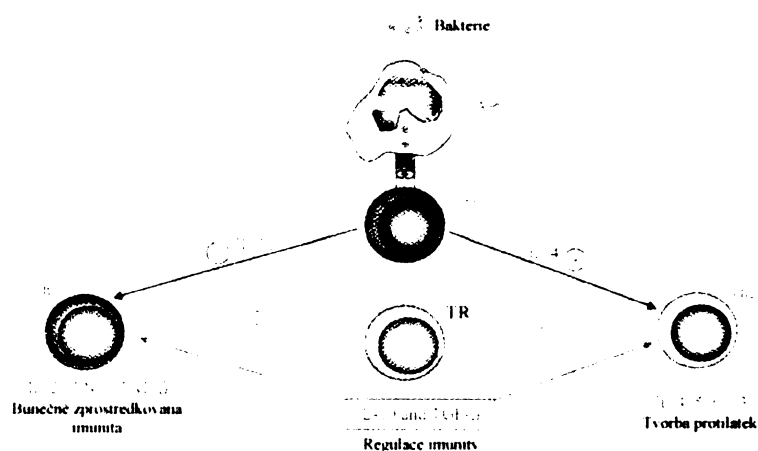
4.4.2.2.2. Význam regulačních T buněk v regulaci autoimunitních procesů

Reakce lymfocytů v tkáni je namířená nejen proti patogenním bakteriím, ale také proti vlastním složkám organismu (Yamazaki a Nakajima 2004). U pacientů s parodontitidou byly zjištěny klony T lymfocytů specifických vůči kolagenu I (Wassenaar a spol. 1995) nebo HSP-60 (Yamazaki a spol. 2002). Analýzou nukleotidové sekvence T receptoru bylo zjištěno, že klony T lymfocytů, reaktivní vůči lidskému HSP-60, se akumulují v tkáni postižené parodontitidou (Yamazaki a spol. 2002). Po stimulaci HSP-60 produkovaly tyto buňky vysoké hladiny IFN- γ , ale po stimulaci GroEL *P. gingivalis* k aktivaci nedošlo, přestože má GroEL podobnou stavbu jako HSP-60.

K eliminaci většiny autoreaktivních buněk dochází již při jejich vývoji v thymu mechanismem klonální delecce. Část autoreaktivních T buněk je běžně přítomna v periferní krvi v neaktivním stavu tzv. anergii. V udržování tolerance mají velký význam regulační T buňky (McGuirk a Mills, 2002), které nejen tlumí autoimunitní klony buněk, ale podílejí se také na předcházení rozvoje autoimunitních procesů v průběhu zánětlivé imunitní reakce.

Mezi regulační T buňky patří Th3 a T_R buňky. Th3 buňky produkují vysoké koncentrace TGF- β a IL-10, mají tlumivý účinek a podílejí se zejména v navození orální tolerance (tj. potlačení imunitní reakce namířené např. proti potravinovým antigenům). T_R buňky jsou CD4⁺ CD25⁺ buňky, které navíc exprimují na svém povrchu molekulu CTLA-4. Tyto buňky produkují vysoké koncentrace IL-10 a TGF- β (Obr. č. 10). Po stimulaci T receptoru T_R buňky proliferují a tvoří IL-2.

Pokud se dostanou do kontaktu s CD4⁺ CD25⁻ buňkou, pak dojde na základě mezibuněčné interakce k inhibici tvorby IL-2 (Thornton a Shevach 1998). Významnou roli zde hraje molekula CTLA-4, která je konstitutivně



Obrázek č. 10 - Význam T_R buněk v regulaci Th1 a Th2 imunitní reakce (Yamazaki a Nakajima 2004)

exprimovaná na povrchu T_R buněk (McGuirk a Mills 2002). Přesný průběh této reakce není dosud objasněn. Pokud dojde k odstranění T_R buněk z organismu, pak dochází k navození patologické reakce namířené proti bakteriím či složkám organismu - například k rozvoji chronického zánětu střev (Sakaguchi a spol. 1995, Takahashi a spol. 1998, Singh a spol. 2001).

Určitou roli v ovlivnění skladby T lymfocytů v tkáni hraje také proces apoptózy, který je stimulován produkty bakterií. Patogenní bakterie indukují apoptickou buněčnou smrt T lymfocytů izolovaných z periferní krve pacientů s parodontitidou (Geatch a spol. 1999). Mangan a spol. (1991) prokázali, že po stimulaci leukotoxinem dochází k významnému nárůstu apoptózy leukocytů. Apoptóza může být navozena také působením kyseliny máselné, která je produkována *P. gingivalis* (Kurita – Ochiai a spol. 1997) nebo lipopolysacharidem (Isogai a spol. 1996).

Pochopení významu T lymfocytů v regulaci imunitní reakce v tkáni parodontu povede k vyvinutí nových léčiv, které by pomocí imunomodulace ovlivnili průběh zánětlivé reakce. V Tab. č. 3 jsou souhrnně uvedeny současné poznatky o T buňkách přítomných v tkáních parodontu pacientů s gingivitidou a parodontitidou.

Tabulka č. 3 - Charakterizace T buněk přítomných v lézích (Yamazaki a Nakajima 2004)

	Gingivitida	Parodontitida
CD4 vs. CD8	CD4 > CD8	různé
HLA-DR	++	++
T _R buňky	±	+
Th1 / Th2	Th1 = Th2	Th1 < Th2, Th1 > Th2
Klonalita	vysoká	vysoká
NKT buňky	+	++
Autoreaktivní buňky	±	+

4.4.2.3. B lymfocyty

Léze v parodontu obsahují velké množství B lymfocytů a plazmatických buněk produkujících protilátky. Sledováním fenotypu těchto buněk bylo zjištěno, že se jedná převážně o aktivované CD25⁺ a CD23⁺ B lymfocyty (Gemmell a Seymour 1991). K aktivaci B lymfocytů je kromě přítomnosti antigenu nezbytný kontakt s T lymfocytem (Noelle a Snow 1991), a proto produkce imunoglobulinů závisí na poměru T a B lymfocytů. Zatímco produkce imunoglobulinů vzrůstá lineárně se zvýšeným počtem Th2 lymfocytů vyskytujících

se v okolí B lymfocytů, v přítomnosti Th1 lymfocytů je nejvyšší tvorba protilátek při stejném poměru Th1 a B lymfocytů (Del Prete a spol. 1991).

Bakteriemi aktivované B lymfocyty produkují protilátky izotypu IgG, ale též IgA a IgM (Tew a spol. 1989). Tyto protilátky je možné detekovat jak v sulkulární tekutině pacientů s onemocněním parodontu, tak po *in vitro* kultivaci buněk izolovaných z tkáně (Mc Ghee a spol. 1989, Ogawa a spol. 1989). Produkce IgA je u pacientů s časnou parodontitidou vyšší ve zdravých lokalitách, naopak v poškozených místech převažuje produkce IgG (Bártová a spol. 1995). Plazmatické buňky produkují protilátky izotypu IgG₂ namířené proti povrchovým polysacharidům bakterií a protilátky izotypu IgG₃ namířené proti bakteriálním proteinům (Niesengard a spol. 1994).

Produkce specifických protilátek vyžaduje přítomnost specifických T buněk (Bird a spol. 1995). Význam T buněk byl potvrzen v experimentu (Katz a Michálek 1996), při kterém byly Fisher potkanům, infikovaným *P. gingivalis*, odebrány slezinné T lymfocyty. Ty byly následně přeneseny do nude Fisher potkanů (tj. kmen potkanů bez thymu tudíž i bez T lymfocytů), kteří byli následně imunizováni *P. gingivalis*. Potkani, kteří obdrželi aktivované T lymfocyty, produkovali signifikantně vyšší hladiny IgG (zejména IgG₂), které korelovaly se sníženou resorpcí alveolární kosti, na rozdíl od nude Fisher potkanů bez přenesených T lymfocytů.

Ačkoliv jsou patogenní bakterie silně imunogenní, je často účinek specifických protilátek nevýrazný. Může to být způsobeno jejich nedostatečnou koncentrací v tkáni, poškozením struktury protilátek proteázami uvolňovanými z patogenních bakterií nebo specifické protilátky nemají samy o sobě baktericidní účinek, ale vyžadují přítomnost komplementu nebo fagocytujících buněk. Při poruše činnosti PMN pak nejsou protilátky účinné (Seymour a spol. 1993).

4.4.2.3.1. Polyklonální aktivace B lymfocytů a tvorba autoprottilátek

Bakterie zubního plaku, zejména fusobakterie, aktinomycey a bakteroidy, jsou významnými polyklonálními aktivátory (Bick a spol. 1981). Nespecifická polyklonální aktivace B lymfocytů je vyvolána antigeny s pravidelně se opakující strukturální jednotkou např. LPS, které jsou schopné přemostit imunoglobulinové receptory B lymfocytu a tak jej aktivovat. Cytokiny potřebné k diferenciaci B lymfocytu na plazmatickou buňku jsou produkovány makrofágy a NK buňkami. Polyklonální aktivace B lymfocytů v tkáni pacientů vede k nadměrné produkci protilátek (hypergamaglobulinémii) a tvorbě imunokomplexů. Hromaděním imunokomplexů se aktivuje cytotoxická reakce a dochází k poškození tkáně

parodontu (Van Dyke a spol. 1995). Nespecifická aktivace B lymfocytů je u zdravých jedinců kontrolována T lymfocyty s tlumivými účinky.

Při polyklonální aktivaci B lymfocytů může dojít také k tvorbě autoprotilátek. V sérech pacientů s parodontitidou byly detekovány zvýšené hladiny protilátek proti proteoglykanům a proti kolagenu typu I a III (Hirsch a spol. 1988, Anusaksathien a spol. 1992, Bártová a spol. 1995). B buňky produkující autoprotilátky proti kolagenu typu I byly detekovány v periferní krvi pacientů s AP pomocí metody ELISPOT (Jonsson a spol. 1991). Autoprotilátky proti kolagenu typu I byly detekovány také v homogenátech tkání pacientů s parodontitidou a jejich koncentrace v tkáni byla vyšší než v séru pacientů (Rajapakse a Dolby 2004).

Zvláštní skupinu buněk, které se uplatňují v patogenezi autoimunitních onemocnění, tvoří CD5+B buňky nazývané B-1a buňky (Kantor 1991). Tyto buňky se nevyvíjejí v kostní dřeni jako konvenční B lymfocyty, ale z peritoneálních prekursorových buněk. Produkují protilátky pouze izotypu IgM. Významným růstovým faktorem B-1a buněk je IL-10. Signifikantně vyšší koncentrace B-1a lymfocytů byly detekovány v krvi pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou (Afar a spol. 1992, Berglundh a spol. 2002) a také v lézích pacientů s chronickou parodontitidou (Sugawara a spol. 1992, Berglundh a spol. 2002). Aramaki a spol. (1998) dále zjistili, že zvýšená koncentrace těchto buněk v tkáni parodontu je asociována s vysokou koncentrací IL-10. Předpokládá se, že parodontální patogeny stimulují vysokou produkci IL-10, která aktivuje B-1a buňky a tím podporují tvorbu autoprotilátek (Berglundh a Donati, 2005). Autoři dále soudí, že zvýšená koncentrace B-1a buněk v krvi pacientů může být rizikovým faktorem z hlediska rozvoje onemocnění parodontu.

4.5. Závěry

Cílem současného výzkumu je ojasnit procesy, které vedou k progresi onemocnění parodontu do té míry, aby bylo možné vytipovat vysoce rizikové pacienty a u těchto osob předejít rozvoji onemocnění pomocí protizánětlivé, cytokinové nebo genové terapie (Seymour a spol. 1996). Současně se pracuje na vývoji vakcín proti parodontitidě (Persson a spol. 2005). Jejich aplikace by byla vhodná zejména u pacientů s aterosklerózou a u těhotných pacientek, které měly v minulosti předčasný porod. U těchto osob by vakcinace mohla pomoci potlačit negativní působení bakterií zubního plaku na systémovou imunitní reakci.

Jisté je, že kvalitní péče o chrup a pravidelná návštěva stomatologa resp. parodontologa je tou nejlepší a nejlevnější prevencí rozvoje onemocnění parodontu pro naprostou většinu populace.

5. CÍLE PRÁCE

Z uvedeného přehledu vyplývá, že v patogenezi parodontitidy se uplatňuje celá řada mechanismů. Zejména v průběhu rozvinuté parodontitidy dospělých a nebo u pacientů s agresivní parodontitidou se tyto procesy vzájemně prolínají a je tak obtížné najít mezi nimi vzájemné vztahy. Mnohdy je nemožné rozeznat, které mechanismy se uplatňují v samém nástupu imunitní reakce, a které jsou naopak průvodním znakem již rozvinuté choroby. Z tohoto důvodu je významné sledovat změny v imunitní odpovědi u mladých pacientů s parodontitidou, kteří mají teprve mírné známky onemocnění.

Studiu imunitní reakce u pacientů s časnou parodontitidou se věnuji od roku 1995. Této problematice byla věnována i moje diplomová práce nazvaná „Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy“, která byla obhájena v roce 1998.

Na základě tehdy známých výsledků bylo definováno několik postupných cílů, které v průběhu dalšího řešení získaly následující podobu:

- Osvětlit vztah mezi genetickou predispozicí pacientů, přítomností patogenních bakterií a progresí onemocnění.
- Ověřit význam poruchy funkce neutrofilních granulocytů v patogenezi onemocnění a zjistit, zda dochází po provedení konzervativní terapie k úpravě jejich funkce.
- Zjistit, zda se liší produkce Th1 a Th2 cytokinů po stimulaci bakteriemi u pacientů a jejich zdravých sourozenců.
- Posoudit rozdíly v produkci cytokinů a v počtu buněk, které je tvoří, po stimulaci vlastním a cizím kmenem *Actinobacillus actinomycetemcomitans* u pacientů a zdravých osob. Zjistit rozdíly v produkci imunoglobulinů po stimulaci vlastním a cizím kmenem *Actinobacillus actinomycetemcomitans* u pacientů a zdravých osob.
- Blíže definovat význam polyklonální tvorby imunoglobulinů v patogenezi parodontitidy. Zjistit, zda porucha inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů koreluje se zhoršením stavu parodontu u pacientů s časnou parodontitidou. Definovat, které cytokiny mohou být zodpovědné za *in vitro* inhibici polyklonální tvorby imunoglobulinů u pacientů s parodontitidou.
- Aplikovat metodiku na jiný typ onemocnění a potvrdit tak účinek *in vitro* polyklonální aktivace na produkci imunoglobulinů u pacientů s imunodeficity. Zároveň sledovat modulační efekt infúze intravenózních imunoglobulinů na *in vitro* polyklonální tvorbu imunoglobulinů .

- Na základě biochemického vyšetření séra ověřit, zda u pacientů s časnou parodontitidou dochází již v mladém věku k rozvoji aterosklerózy. Na základě genetické analýzy vytipovat pacienty se zvýšeným rizikem rozvoje aterosklerózy.

Výsledky této studie jsou součástí publikací:

- J. Bártová, Z. Krátká, J. Procházková, O. Krejsa, J. Dušková, L. Mrklas, H. Tlaskalová and B. Cukrowská - **TH1 and TH2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings**. Mediators and Inflammation 2000; 9: 115 - 120.
- Z. Krátká, J. Bártová, O. Kryštůfková, K. Benetková, L. Mrklas and T. Fučíková - **Effect of intravenous immunoglobulins on *in vitro* immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency**. APMIS 2002; 110: 205-13.
- Z. Krátká, J. Bártová, O. Krejsa, M. Otčenášková, T. Janatová and J. Dušková - **Interleukin-1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early-onset periodontitis**

6. MATERIÁL A METODY

6.1. Charakteristika pacientů a kontrolních osob

6.1.1. *Pacienti s časnou parodontitidou*

Počátky studie imunitních mechanismů v patogenezi časně parodontitidy ve Výzkumném ústavu stomatologickém (Všeobecná fakultní nemocnice Praha) spadají do let 1990 – 1992 (Krejsa a spol. 1993), kdy byli pacienti vyhledáváni v rámci systematických stomatologických prohlídek nebo byli doporučeni do VÚS z jiných stomatologických pracovišť. Soubor pacientů byl rozšířen v návazné studii v letech 1993 – 1995 (Procházková a spol. 1996, Bártová a spol. 1996). Z celkového počtu 9225 vyšetřených osob jich bylo k podrobnějšímu vyšetření vybráno 106.

Základní diagnostické kritérium onemocnění časná parodontitida (EOP) zahrnuje přítomnost alespoň jednoho parodontálního chobotu hlubokého $\geq 3,5$ mm v oblasti stoliček a nebo řezáků, zánět gingivy a přítomnost *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) v sulkulární oblasti. Ze 106 vyšetřených osob byla bakterie *A. a.* detekována u 48 osob ve vzorcích sulkulární tekutiny odebrané ze sulku resp. parodontálního chobotu. Tato skupina pacientů zahrnovala 19 mužů a 29 žen ve věku 15 – 26 let, bez celkového onemocnění.

V rámci genetické studie (Procházková a spol. 1996) bylo vyšetřeno také 47 sourozenců pacientů, z nichž 28 mělo zdravý parodont a u 19 byla diagnostikována časná parodontitida. Unikátnost tohoto souboru pacientů spočívá v tom, že vyšetřované osoby byly vybrány při screeningovém vyšetření ještě před tím, než byla časná parodontitida diagnostikována v rámci pravidelné stomatologické prohlídky. Další nespornou výhodou souboru je jeho rasová jednotnost.

V průběhu let 1995 – 2005, kdy jsem se účastnila výzkumu, docházelo postupně k úbytku počtu pacientů. Pravidelně však byla klinicky a imunologicky sledována skupina 20 pacientů s EOP. Nepravidelně, podle jejich možností, bylo sledováno dalších deset osob.

6.1.2. *Zdraví sourozenci a kontrolní osoby*

Kontrolní skupinu tvořilo devět zdravých sourozenců pacientů (15 – 23 let), kteří měli zdravý parodont, ale zároveň byla u nich v sulku detekována bakterie *A. a.* Tito zdraví sourozenci mají vyšší genetickou predispozici k rozvoji onemocnění parodontu vzhledem k výskytu časně parodontitidy v rodině.

Dále byla sledována kontrolní skupina 20 zdravých osob se zdravým parodontem ve věku 17 – 27 let. V tomto kontrolním souboru nebyla prokázána přítomnost bakterie *A. a.* v sulku.

Od všech vyšetřovaných osob (pacientů i kontrol) byl získán informovaný souhlas dle konvencí Helsinské deklarace (1992) k odběru materiálu (sulikulární tekutiny a krve) pro mikrobiologická, imunologická a genetická vyšetření.

6.1.3. Klinické vyšetření a konzervativní terapie

Pacienti byli nejprve vyšetřeni a poté jim bylo provedeno konzervativní ošetření parodontu. Stupeň zánětu gingivy byl zjišťován gingiválním indexem (GI), jehož hodnoty a charakteristiky jsou uvedeny v Tab. č. 4 (Löe a Silness 1963). Hloubka parodontálních chobotů byla měřena WHO (World Health Organization) sondou. Rozsah postižení parodontu byl hodnocen indexem CPITN (Community Periodontal Index of Treatment Needs), jehož hodnoty jsou uvedeny rovněž v Tab. č. 4 (Ainamo a spol 1982). Hodnotilo se vždy šest sextantů zubů (tři v horní a tři v dolní čelisti). Pro stanovení diagnózy parodontitida bylo nutné dosažení hodnoty CPITN ≥ 3 alespoň v jednom sextantu. Při vstupním vyšetření a v případě progresu onemocnění byly zhotoveny rentgenogramy chrupu.

Tabulka č. 4 - Přehled charakteristických znaků pro určení gingiválního indexu (GI) a CPITN indexu

Gingivální index	
0	Zdravá tkáň bez známek zánětu
1	Mírně zarudlá, mírný otok, nekrvácí
2	Zarudnutí, hypertrofie, otok, krvácí při vyšetření
3	Výrazné zarudnutí, hypertrofie, otok, ulcerace, krvácí spontánně

CPITN	
0	Zdravý parodont
1	Krvácení při vyšetření
2	Zubní kámen
3	Parodontální chobot 4-5 mm
4	Parodontální chobot 6 mm a více
x	Ztráta zubu

Konzervativní ošetření parodontu zahrnovalo odstranění zubního kamene, opravení nevyhovujících výplní, eventuelně korunek a dokonalé vyčištění chrupu. Všichni pacienti byli názorně poučeni o tom, jak správně provádět domácí hygienickou péči včetně masáží dásní. Zároveň byli upozorněni, že dokonalé udržování ústní hygieny je rozhodující složkou parodontologické terapie. Dále byla provedena kontrola hygienických návyků a případně byla zopakována hygienická instruktáž v případech, kde domácí péče nebyla dostatečně zvládnuta.

V prvním roce byla léčba pacientů intenzivní (Tab. č. 5). Po vstupním vyšetření, kdy byl odebrán materiál na detekci *A. a.*, byli pacienti konzervativně ošetřeni. Po dvou týdnech byli opět vyšetřeni, případně znovu konzervativně ošetřeni a všem bylo ordinováno širokospektré antibiotikum Tetracyklin (Spofa) v celkové dávce 15g v průběhu 14 dní. Pacienti byli poté zváni na kontrolní vyšetření po 1, 3 a 6 měsících po aplikaci antibiotik. Další kontrolní vyšetření byla prováděna s odstupem půl roku nebo v případě zhoršení klinického stavu parodontu i dříve.

Tabulka č. 5 - Schéma léčby pacientů v prvním roce terapie

Vyšetření	Odběr mikrobiologického materiálu	Vyšetření parodontu	Konzervativní terapie	Hygienická instruktáž	Antibiotická léčba
vstupní	*				
2. týden		*	*	*	
4. týden		*	*	*	*
8. týden	*	*	*		
12. týden		*	*		
28. týden		*	*		
1 rok		*	*		

6.2. Roztoky a chemikálie

TK voda (TK H₂O) - deionizovaná voda , ÚMG AV Praha

Fosfát - fyziologický roztok (PBS) : 45g NaCl, 6g Na₂ HPO₄.12H₂O a 0,5g NaH₂PO₄.H₂O rozpustit v 5l destilované vody, pH roztoku= 7,2 - 7,4

Fosfát - fyziologický roztok s Tweenem (PBS+Tween) : do 0,5l PBS přidat 0,5ml Tweenu (Tween 20, Serva)

Hanksův pufr bez hořečnatých a vápenatých iontů (HBSS) -ÚMG ČÚV Praha, pH = 7,2 - 7,4

X-Vivo 10 médium (Bio Whittaker TM)

Kultivační X-Vivo médium do 100ml X-Vivo10 média přidat 1ml roztoku l-glutaminu (Sevac, 25mg/ml)

Histopaque (Sigma) používá se neředěný o hustotě 1,077g/ml

- **Mikrobiologické a molekulárně biologické metody**

TSBV agar (TSBV médium, Que Bact) – 41g rozpustit v 1l H₂O, roztok autoklávovat 15min při 121°C, nanést 15ml roztoku na Petriho misku o průměru 10cm

Brain Heart Infusion (Oxoid) – 37g BHI rozpustit v 1l H₂O, roztok autoklávovat 15min při 121°C

Lyzační roztok – 20mM TrisCl (Roth) pH = 8, 2mM EDTA (Roth), 1,2% Triton X-100 (Serva), 20 mg/ml lysozyme

PCR – DNA polymeráza DyNAzyme II (Finnzymes) 2U/μl + pufr Buffer pro DyNAzyme II (Finnzymes)

2% agarózový gel na elektroforézu (Top-Bio, PCR agarose TB)

- **Metoda INT**

Roztok INT (3,4-jodfenyl-2,4-nitrofenyl-5-fenyl-tetrazoliumchlorid, SIGMA) 0,1g INT rozpustit ve 100ml PBS

Opsonizovaný zymozan (Zym)

100mg zymozanu A (ze *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) rozpustit v 5ml PBS a roztok zymozanu inkubovat 10min v lázni teplé 80°C. Vzorek centrifugovat 7min při 200g, supernatant slít a k sedimentu přidat PBS a opět centrifugovat. Takto vzorek promýt ještě dvakrát. Po poslední centrifugaci naředit v 5ml PBS. Uchovávat zamražený.

Před testem zymozan rozpustit a přidat 0,5ml séra a inkubovat 20 - 30 minut při 37°C. Po této opsonizaci vzorek třikrát promýt v PBS. Po posledním promytí naředit sediment v 1ml HBSS.

Dimethylsulfoxid (DMSO)- ISN Biochemicals, používat neředěný

- **Stimulace buněk**

Pokeweed mitogen - PWM (Sigma) naředit v X-vivo médiu na koncentraci 20μg/ml

Concanavalin A - ConA (Sigma) naředit v X-vivo médiu na koncentraci 100μg/ml

Actinobacillus actinomycetemcomitans (CCM 6053) - suspenze bakterií o koncentraci 10⁹ buněk/ml byla inaktivována inkubací 20min při 120°C. Vzorek byl centrifugován 10min při 600g. Sediment byl naředěn v PBS a centrifugován 10min při 600g. Sediment byl promyt

celkem 3krát. Po promytí byl sediment naředěn X-vivo médiem tak, aby optická denzita odpovídala koncentraci 10^9 buněk / ml.

Escherichia coli – standardní kmen O86 byl laskavě poskytnut Prof. MUDr. H. Tlaskalovou, DrSc. MBÚ ČAV, Praha. Kultura bakterií byla teplotně inaktivována varem a naředěná v X-vivo médiu na koncentraci 10^9 buněk/ml.

- **Metody ELISA**

Roztok BSA (bowine serum albumine): 1g BSA rozpustit ve 100ml H₂O dest.

0,1M fosfátový ELISA pufr: 35,8g Na₂HPO₄.12H₂O a 13,8g NaH₂PO₄.H₂O bylo rozpuštěno v 1l H₂O dest., pH=6

Roztok orthophenyldiaminu (OPD): ve tmě v 10ml ELISA pufru rozpustit 5 mg OPD (LOBA chemicals), po rozpuštění OPD přidat 8μl 30% roztoku H₂O₂.

Protilátky a standardy použité při stanovení koncentrace imunoglobulinů

Primární vazebná specifické polyklonální protilátky (prasečí x lidské) ÚSOL, Praha: Q-SwaHu/IgM, Q-SwaHu/IgG, Q-SwaHu/IgA o počáteční koncentraci 10μg/ml - 40μl protilátky rozpustit v 10ml PBS, nanášet po 100μl /jamku.

Detekční specifické polyklonální protilátky (prasečí x lidské) kojugované s peroxidázou ÚSOL, Praha: Q-SwaHu IgM/px, Q-SwaHu IgG/px, Q-SwaHu IgA/px. Dodávaná koncentrace protilátek je 2mg/ml - 10μl konjugátu naředit do 9ml PBS s 1ml fetálního telecího séra (FTS, Sigma), aplikovat 100μl roztoku / jamku.

Standard - normální lidské sérum s definovaným množstvím imunoglobulinů (ÚSOL, Praha) o počáteční koncentraci 2,65μg/ml IgM, 19,1μg/ml IgG, 4,58μg/ml IgA. Dále ředíme desítkovou řadou v X-vivo médiu.

6.3. Odběr materiálu

6.3.1. Odběr sulkulární tekutiny

Na základě klinického vyšetření byly vybrány lokality pro odběr sulkulární tekutiny, a to místa s maximálními parodontálními choboty v postranních partiích chrupu a kontrolní zdravá místa zpravidla v oblasti premolárů a špičáků. Pro kultivaci bakterií byl obsah parodontálního chobotu či gingiválního sulku nasán do 2ml stříkačky s jehlou a ihned přenesen do 2ml média Brain Heart Infusion. Pro izolaci DNA z bakterií byl vzorek sulkulární tekutiny odebrán pomocí nitrocelulózového čipu microDent[®], který byl poté ponořen do lyzačního média.

6.3.2. Odběr krve

Pro imunologická vyšetření bylo odebráno 20ml žilní krve do vakuových zkumavek „Vacuette Sodium Heparin“ (tzv. nesrážlivá krev) a 10ml krve do vakuových zkumavek „Vacuette Serum sep. Clot Activator“ určených k separaci séra (tzv. srážlivá krev).

Pro genetické vyšetření bylo odebráno 5ml krve do vakuových zkumavek „Vacuette EDTA“.

6.4. Mikrobiologická studie

6.4.1. Kultivace bakterií

Pro kultivaci bakterií byl odebrán vzorek sulkulární tekutiny z lokalit s nejtěžším postižením parodontu. Vzorek naředěný 2ml Brain Heart média byl v množství 50 μ l očkovan na povrch mikrobiologických diagnostických pŕd v Petriho miskách. Selektivní kultivace *A. a.* byla provedena dle metody popsane Slotsem (1982) na TSBV agaru inkubovaném při 37°C v 10% CO₂ atmosféře, která byla vytvořena pomocí sáčekŕ GasPak CO₂ (Oxoid) v anaerobním hrnci. Nárŕst kolonií bakterií byl vyhodnocen po 5 až 7 dnech. Poté byla kolonie *A. a.* naočkována do tekutého BSA média a kultivována 1-2 dny při 37°C. Po nárŕstu bakterií byla kultura inaktivována inkubací 20min při 120°C. Vzorek byl centrifugován 10min při 600g. Sediment byl naředěn v PBS a centrifugován 10min při 600g. Sediment byl promyt celkem třikrát. Po promytí byl sediment naředěn X-vivo médiem tak, aby optická denzita odpovídala koncentraci 10⁹ buněk/ml.

6.4.2. Detekce bakterií pomocí reverzní hybridizace bakteriální DNA

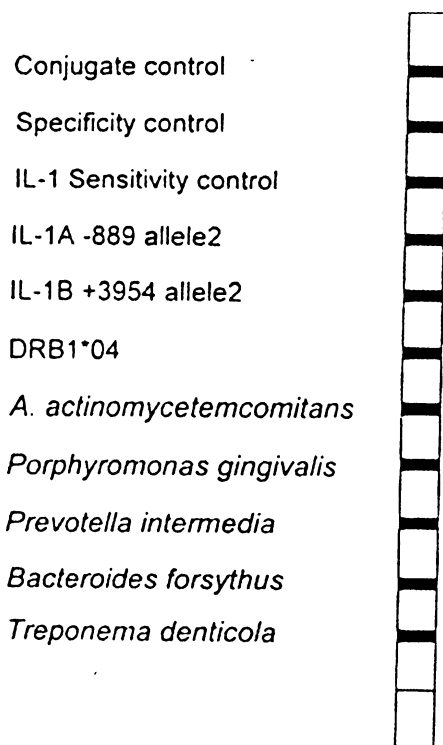
K detekci bakterií v parodontálním chobotu resp. gingiválním sulku se v současné době používají diagnostické sety založené na metodě reverzní hybridizace bakteriální DNA se specifickými sondami zakotvenými na povrchu nitrocelulózových proužků. Tímto způsobem je možné přesně a relativně rychle zjistit přítomnost řady patogenních bakterií ve vzorku.

DNA bakterií byla izolována ze sulkulární tekutiny alkalickou lŕzou pomocí soupravy DNeasy Tissue Kit (Qiagen) a izoláty DNA byly zamraženy.

K detekci bakteriální DNA byla použita souprava Periodontitis Plus (GenID[®] GmbH). PCR reakce byla provedena s primery (Primer Nukleotid Mix- PNM) specifickými pro detekci bakteriálních patogenŕ, které byly značeny biotinem. Reakční směs obsahovala 5 μ l DNA (o konc. 30 – 60 ng/ μ l), 15 μ l PNM, 5 μ l 10x polymerase buffer s MgCl₂ (o výsledné koncentraci 2,5 mM), 1 μ l DyNAzyme II DNA Polymerase a 24 μ l H₂O. PCR reakce probíhala

v termocykléru UNOII (Biometra) podle protokolu uvedeném v soupravě. Přítomnost namnožených úseků DNA byla potvrzena elektroforeticky ve 2% agarózovém gelu.

Reverzní hybridizace byla dělána podle protokolu uvedeném v soupravě PeriodontitisPlus®. Při této reakci došlo k hybridizaci namnožené DNA se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami imobilizovanými na povrchu nitrocelulózových proužků. Každý proužek obsahoval sondy specifické k průkazu bakterií *A. a.*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* a *T. denticola* a také k průkazu genetických markerů pro IL-1A a IL-1B a HLA-DR4 (podrobně specifikováno níže v kapitole Genetické vyšetření). Po specifické hybridizaci byla přidána alkalická fosfatáza značená streptavidinem, která reagovala s biotinem značenou DNA. Komplex byl detekován barevnou reakcí s NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-phosphate). Přítomnost barevných proužků byla porovnána s přiloženým vzorem (Obr. č. 11).



Obrázek č. 11 - Detekce přítomnosti patogenních bakterií a polymorfismu v genech pro IL-1A a IL-1B pomocí metody hybridizace DNA soupravou Periodontitis

6.5. Genetické vyšetření

6.5.1. Využití metody hybridizace DNA k detekci IL-1A a IL-1B polymorfismu a HLA-DR4

Riziková alela-2 genu IL-1A (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici -889) a riziková alela-2 genu IL-1B (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici +3954) byly detekovány metodou hybridizace DNA. V rámci studie byly použity dvě různé soupravy – GenoType PST[®] (Hain lifescience) a PeriodontitisPlus[®] (GenID GmbH). Souprava GenoType PST[®] umožňoval detekci rizikové i nerizikové alely u obou genů IL-1A a IL-1B. Souprava PeriodontitisPlus[®] detekovala přítomnost pouze rizikových alel-2 obou genů, ale navíc umožnil detekovat ještě přítomnost genu HLA-DR4 a přítomnost bakterií (viz výše). Obě soupravy jsou založeny na stejném principu, liší se pouze použitými specifickými primery a z toho vyplývajícími podmínkami PCR reakce.

DNA byla izolována z krve pomocí soupravy QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) a kvantifikována soupravou Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR reakce byla provedena s biotinem značenými primery PN-IL1+ (PeriodontitisPlus) a nebo pomocí biotinem značenými primery PN mix (GenoType) dle protokolů uvedených v použitých soupravách. Přítomnost namnožených úseků DNA byla potvrzena elektroforeticky ve 2% agarózovém gelu.

Reverzní hybridizace byla provedena podle instrukcí uvedených v soupravách PeriodontitisPlus nebo GenoType. DNA hybridizovala se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami, které byly imobilizovány na povrchu nitrocelulóзовých proužků. Po specifické hybridizaci byla přidána alkalická fosfatáza značená streptavidinem, která reagovala s biotinem značenou DNA. Komplex byl detekován barevnou reakcí s NBT/BCIP (PeriodontitisPlus) nebo AP (GenoType). Přítomnost barevných proužků byla porovnána s přiloženým vzorem (Obr. č. 11).

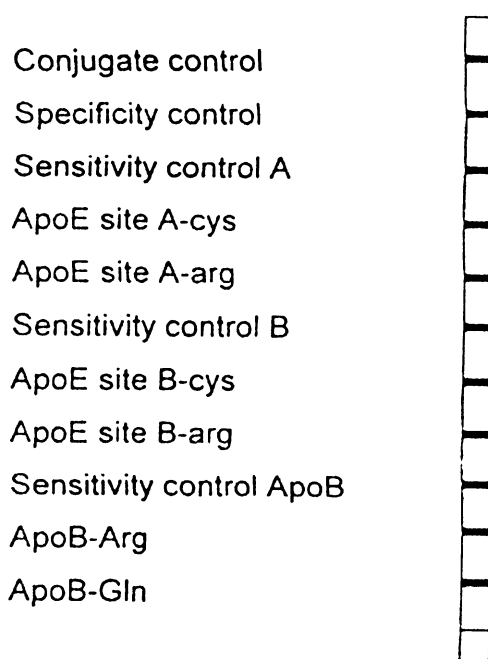
6.5.2. Využití metody hybridizace DNA k detekci polymorfismu apolipoproteinu E (ApoE) a apolipoproteinu B (ApoB)

Metodou hybridizace DNA pomocí testovací soupravy Apolipoprotein E a B (GenID® GmbH) byla u pacientů zjišťována přítomnost alel pro apolipoprotein – *apo ε2*, *apo ε4* a *apo B-100 Arg3500Gln*, které jsou rizikové v patogenezi Alzheimerovy choroby, hyperlipoproteinémie a aterosklerózy.

DNA byla z krve izolována pomocí soupravy QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) a kvantifikována soupravou Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

PCR reakce byla provedena s biotinem značenými primery ApoE-PN1, ApoE-PN2 a PN-Mix ApoB dle protokolu uvedeném v soupravě. Přítomnost namnožených úseků DNA byla potvrzena elektroforeticky ve 2% agarózovém gelu.

Podle návodu v soupravě byla provedena reverzní hybridizace DNA se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami, které byly imobilizovány na povrchu nitrocelulóзовých proužků. Po specifické hybridizaci byla přidána alkalická fosfatáza značená streptavidinem, která reagovala s biotinem značenou DNA. Komplex byl detekován barevnou reakcí s NBT/BCIP. Přítomnost barevných proužků byla porovnána s přiloženým vzorem (Obr. č. 12).



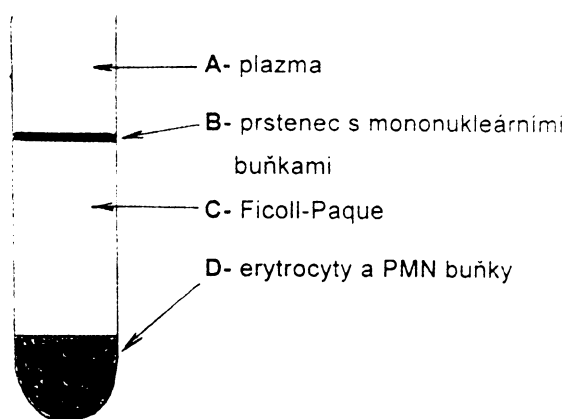
Obrázek č. 12 - Detekce genů *apo ε2*, *apo ε3*, *apo ε4* a *apo B-100 Arg3500 Gln* pomocí soupravy „Apolipoprotein E a B“ (GenID® GmbH)

6.6. Imunologická vyšetření

6.6.1. Izolace mononukleárních a polymorfonukleárních buněk z periferní krve

Mononukleární buňky byly izolovány z periferní krve metodou izolace na gradientu roztoku Ficoll-Paque popsané Boyumem (1968) a Tlaskalovou a spol. (1985).

Krev byla naředěna bezsérovým médiem X-Vivo v poměru 1:1 a poté byla navrstvena na 3ml roztoku Histopaque v 15ml zkumavkách. Vzorky byly centrifugovány 30min při 600g. Po centrifugaci, při které došlo k rozdělení vrstev na základě hustotního gradientu, byla z prstence mezi fázemi získána suspenze mononukleárních buněk (Obr. č. 13). K buňkám bylo



následně přidáno 10ml X-Vivo média a vzorky byly 2x promyty v X-vivo médiu (centrifugace 1x 10 min při 400g a 1x 10min při 200g). Koncentrace buněk byla stanovena po naředění buněk v Türkově roztoku a spočítání v Bürgerově komůrce. Buňky byly naředěny na koncentraci 10^7 buněk/ml kultivačním X-vivo médiem.

Obrázek č. 13 - Izolace mononukleárních a polymorfonukleárních buněk pomocí gradientové centrifugace

Sediment obsahující erythrocyty, polymorfonukleární buňky (PMN) a Histopaque získaný po gradientové centrifugaci byl přenesen do skleněných zkumavek obsahujících 0,5ml séra. Zkumavky byly inkubovány v šikmé poloze 45min při 37°C. Supernatant, který se oddělil během této inkubace, byl naředěn v PBS pufru a centrifugován 7min při 200g. Sediment byl suspendován v 9ml TK vody a po 20 sekundách byl přidán 1ml 10x koncentrovaného PBS pufru. Suspenze buněk byla centrifugována 7min při 200g a sediment byl rozpuštěn v 1ml HBSS. Buňky byly spočítány a naředěny HBSS roztokem na konečnou koncentraci $2 \cdot 10^6$ buněk/ml.

6.6.2. Kvantitativní stanovení tetrazoliumreduktázové aktivity polymorfonukleárních buněk (INT test)

Kvantitativní stanovení tetrazoliumreduktázové aktivity leukocytů bylo provedeno metodou popsanou Marečkem a Procházkovou (1986).

Do mikrotitrační desky bylo nanášeno 100 μ l PMN buněk (o koncentraci 2.10⁵ buněk/ml) na jamku. Deska byla inkubována 30-45 min při 37°C, pak centrifugována 5min při 270 g a supernatant byl odsán. Do jamek v levé polovině desky bylo přidáno 50 μ l HBSS roztoku a 100 μ l INT. Do jamek v pravé polovině desky bylo přidáno 50 μ l opsonizovaného zymozanu ZYM a 100 μ l INT (Obr. č. 14). Jedna kontrolní řada jamek neobsahovala buňky, ale pouze HBSS + INT a ZYM + INT. Deska byla inkubována 1 hod při 37°C a poté byla centrifugována 5min při 200g. Supernatant byl odstraněn. Reakce byla zastavena inkubací s 50 μ l 2N HCl 10min při pokojové teplotě. Poté byla deska centrifugována. Supernatant byl odstraněn a deska byla vysušena při pokojové teplotě.

Barevná reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l DMSO do každé jamky mikrotitrační

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
C	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
D	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
E	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
F	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
G	○	○	○	○	○	○	○	●	●	●	●	●
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

○	100 μ l buněk + 50 μ l HBSS + 100 μ l INT
○	100 μ l buněk + 50 μ l zymozynu A + 100 μ l INT
○	50 μ l HBSS + 100 μ l INT - kontrola
○	50 μ l zymozanu A + 100 μ l INT - kontrola

desky a následnou inkubací desky 30 - 60min při pokojové teplotě. Intenzita zbarvení byla měřena ELISA readerem SLT Spectra (Lab System) při vlnové délce 490 nm. Z naměřených hodnot byl vypočítán index metabolického vzplanutí (INT index) jako poměr průměrné intenzity zbarvení buněk stimulovaných ZYM a průměrné intenzity zbarvení nestimulovaných buněk. Fyziologické hodnoty INT indexu se v české populaci pohybují v rozpětí 4,0 až 6,6.

Obrázek č. 14 - Schéma aktivacepolymorfonukleárních buněk v INT testu

6.6.3. Stimulace buněk k tvorbě cytokinů a imunoglobulinů

Mononukleární buňky separované z periferní krve (10⁶ buněk/ml) byly stimulovány s mitogeny a bakteriemi při 37°C a 7% CO₂ v atmosféře. Schéma nasazení je uvedeno v Tab. č. 6. Po uplynutí doby určené ke stimulaci (1, 3, 5 nebo 7 dní) byly vzorky centrifugovány 7 min při 200g a supernatant byl uchován při -20°C pro stanovení koncentrace imunoglobulinů a cytokinů metodou ELISA. Buňky byly naředěny v čerstvém kultivačním X-vivo médiu a poté byly použity v metodě ELISPOT.

Tabulka č. 6 - Schéma *in vitro* stimulace mononukleárních buněk

	Buňky (10 ⁷ b/ml)	Stimulace	Kultivační X-vivo Médium
PWM	100μl	100 μl PWM (konc. 20μg/ml)	800 μl
PWM+ConA	100μl	100 μl PWM (konc. 20μg/ml) 100 μl ConA (konc. 100μg/ml)	700 μl
<i>E. coli</i>	100μl	100 μl <i>E. coli</i> (konc. 10 ⁹ b./ml)	800 μl
<i>A. a.</i>	100μl	100 μl <i>A. a.</i> (konc. 10 ⁹ b./ml)	800 μl
nest	100μl		900 μl

6.6.4. Detekce počtu buněk produkujících cytokiny metodou ELISPOT

Počet buněk, které po stimulaci produkují cytokiny, byl stanoven metodou ELISPOT. Byly vyzkoušeny analyzační soupravy firmy Biosource International a firmy Diaclone Research.

Laboratorně jednodušší byla souprava firmy Biosource. Na povrch mikrotitračních desek, které jsou součástí souprav, byly aplikovány primární monoklonální protilátky. Po jejich navázání byly desky promyty a bylo přidáno 1% BSA. Jeho přidáním se blokovala zbylá vazebná místa na povrchu desky tak, aby v dalším kroku nedošlo k nespecifické vazbě cytokinů. Po jeho odstranění byly nanášeny buňky získané po *in vitro* kultivaci v koncentraci 4.10⁵ buněk na jamku. Desky byly inkubovány 5 hodin při 37⁰C a 7% CO₂. Cytokiny produkované jednotlivými buňkami se navázaly na primární protilátky. Desky musely být ponechány v klidu, aby nedošlo k pohybu buněk a vytvořily se zřetelné spoty. Po inkubaci byl obsah desek odstraněn a byla aplikována ledová voda. Po 10 minutové inkubaci na ledové podložce byly desky promyty a byla přidána sekundární protilátka značená biotinem. Po inkubaci a promytí byly přidány protilátky vázané s GABA Φ. Po inkubaci a promytí byly přidány aktivátory reakce. Během 15 – 30 minut se začaly objevovat černé tečky (spoty) v místech, kde došlo k navázání cytokinů (1 spot = 1 buňka). U některých cytokinů bylo vyvíjení reakce delší, např. u IL-10 až čtyři hodiny. Reakce byla zastavena promytím desek destilovanou vodou.

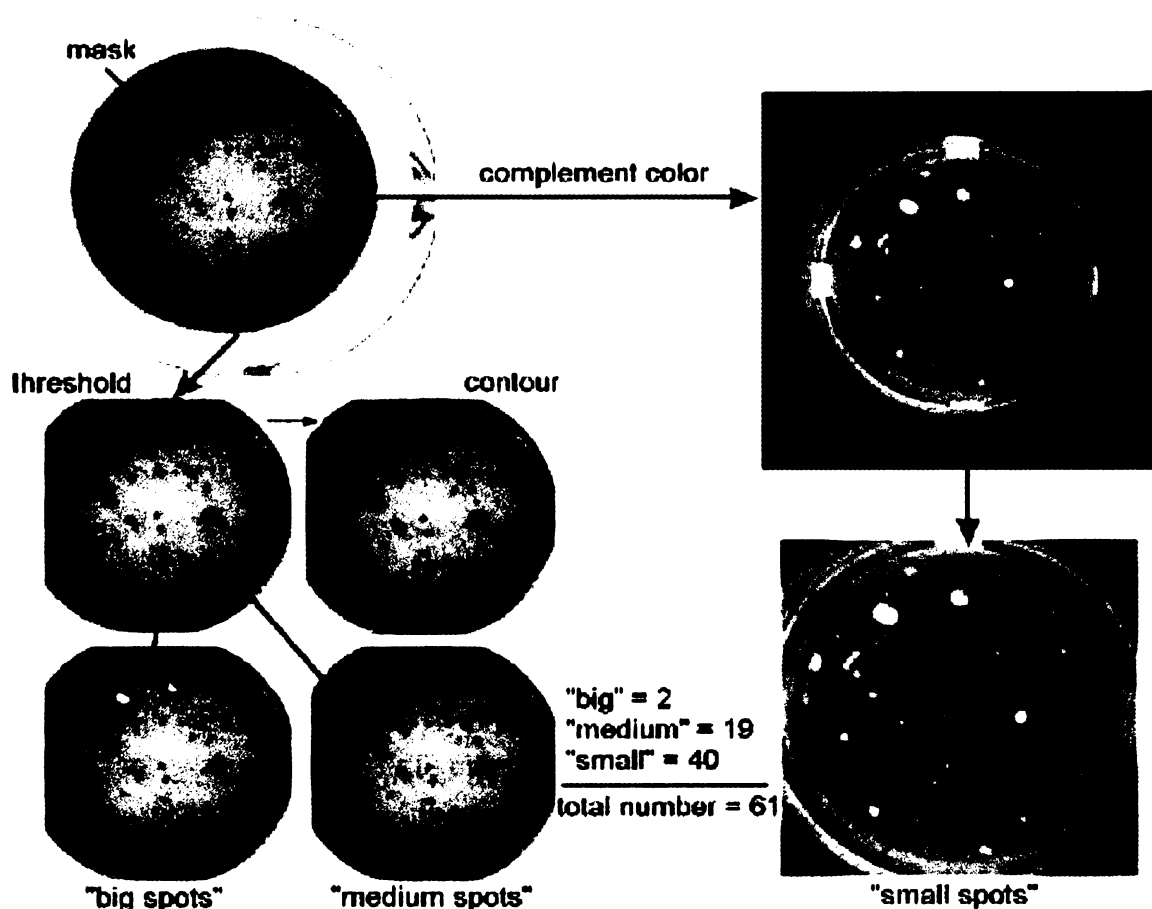
U druhé soupravy (Diaclone Research) byl začátek metody až po aplikaci ledové vody stejný jako u soupravy firmy Biosource. Potom byly přidány monoklonální protilátky asociované s biotinem. Po inkubaci a promytí byla aplikována alkalická fosfatáza asociovaná se streptavidinem. Po inkubaci a promytí byl přidán BCIP substrát rozpuštěný v roztoku agarózy. Aplikace probíhala na ledové podložce. Po ztuhnutí gelu byly desky nejprve inkubovány 30 minut při teplotě 37⁰C, poté při pokojové teplotě. Vývoj reakce trval přibližně

1,5 hodiny. Po objevení modrých spotů byly desky zabaleny do alobalu, aby byly ochráněny před světlem a vysycháním, a poté byly uchovávány v lednici.

6.6.5. Počítačové hodnocení metody ELISPOT

Zhodnocení metody ELISPOT probíhalo ve spolupráci s prom. biol. J. Opatrnou, CSc.. Desky byly nejprve snímány barevnou CCD kamerou (HITACHI HV-C 20) za použití makroobjektivu. Jednotlivé snímky byly analyzovány systémem LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha).

Snímky byly nejprve upraveny zvýšením kontrastu a vyhlazením kontur. Dále byla kruhovou maskou označena plocha jamek, ve které byly počítány spoty (Obr. č. 15). Po prahování spotů, které se dostatečně odlišovaly od pozadí, bylo možno použít binární morfologické funkce, které automaticky stanovily počet, plochu a integrální densitu jednotlivých spotů. Spoty, které nebylo možné prahovat, ale byly přesto zřetelně odlišné od pozadí, byly dodatečně označeny počítačovou myší a spočítány. Na základě plochy spotů, byl zjišťován počet velkých (průměrná plocha $0,0627 \pm 0,0164 \text{ mm}^2$), středních (průměrná plocha $0,0218 \pm 0,0039 \text{ mm}^2$) a malých spotů (průměrná plocha $0,0108 \pm 0,0028 \text{ mm}^2$). Naměřené výsledky byly převedeny do programu Excel (Microsoft).



Obrázek č. 15 - Měření velikosti spotů programem LUCIA

6.6.6. Stanovení koncentrace imunoglobulinů metodou ELISA

Koncentrace imunoglobulinů IgA, IgG a IgM v supernatantech byla stanovena metodou ELISA. Na povrch mikrotitračních desek byly navázány primární Q-SwaHu-IgM, Q-SwaHu-IgA a nebo Q-SwaHu-IgG polyklonální protilátky (Sevac). Jejich ředění je uvedeno v kapitole 4.2. Po promytí desek byla provedena blokáce 1% roztokem BSA. Po promytí desek byly nanášeny supernatanty a standardní séra s definovanou koncentrací imunoglobulinů (Sevac). Po dalším promytí desek byly aplikovány sekundární protilátky asociované s peroxidázou (Q-SwaHu IgM/px, Q-SwaHu IgA/px nebo Q-SwaHu IgG/px). Po inkubaci a promytí byl přidán roztok OPD ve fosfátovém ELISA pufru (pH=6,2) s obsahem H₂O₂. Barevná reakce byla zastavena přidáním 1M H₂SO₄. Intenzita zbarvení byla změřena při 490 nm na SLT Spectra II ELISA readeru a analyzována programem KIME E (Schoeller Pharma, Praha).

6.6.7. Stanovení koncentrace cytokinů metodou ELISA

Koncentrace cytokinů IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ byla zjišťována metodou ELISA. V průběhu studie byly použity různé komerční ELISA soupravy firem Immunotech France a Serotec. Jelikož množství aplikovaných protilátek se lišilo v závislosti na použitém kitu, uvádím zde pouze princip metody, který byl stejný.

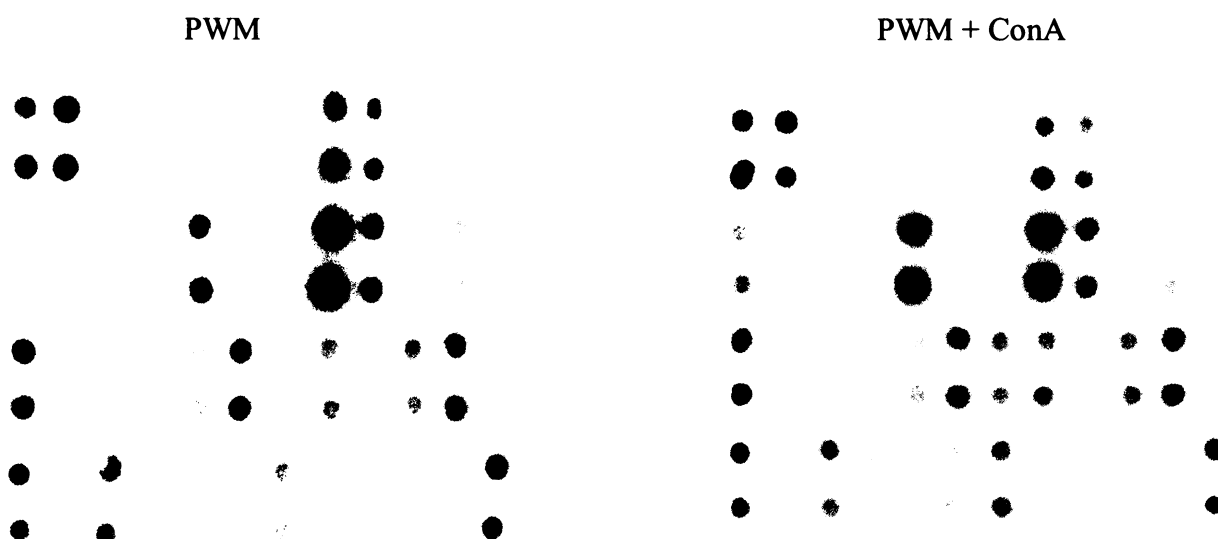
Na povrch desek byly nejprve aplikovány primární monoklonální protilátky. Po inkubaci a promytí byly desky blokovány 1% roztokem BSA. Po inkubaci a dalším promytí byly do jamek desek nanášeny vzorky a standardy. Po inkubaci a promytí byly aplikovány sekundární monoklonální protilátky asociované s biotinem. Po další inkubaci a promytí byl přidán streptavidin asociovaný s křenovou peroxidázou. Po poslední inkubaci a promytí byl aplikován substrát, který reagoval s peroxidázou za vzniku barevného produktu. Reakce byla ukončena přidáním 1M H₂SO₄. Intenzita zbarvení byla změřena na SLT Spectra II ELISA readeru a analyzována programem KIME E.

6.6.8. Detekce produkce cytokinů screeningovou metodou RayBio[®]

Metoda RayBio[®] Human Cytokine Antibody Array patří mezi moderní screeningové metody, pomocí kterých je možné najednou detekovat přítomnost velkého počtu cytokinů v jednom vzorku. Na povrchu nitrocelulózové membrány jsou v definovaných lokalitách navázány primární protilátky proti jednotlivým cytokinům (Tab. č. 7). Po provedení metody se v místech navázání cytokinů objeví skvrny. Porovnáním polohy skvrn s předloženým vzorem lze snadno zjistit přítomnost cytokinů ve zkoumaném vzorku (Obr. č. 16).

Tabulka č. 7 - Detekce cytokinů a dalších prozánětlivých molekul metodou RayBio®

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN - 2	GCSF	GM- CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
B	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN - 2	GCSF	GM- CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
C	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
D	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
E	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
F	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
G	RANTES	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	sTNF RI	sTNF RII	PDGF- BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS
H	RANTES	TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	sTNF RI	sTNF RII	PDGF- BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS



Obrázek č. 16 - Detekce produkce cytokinů mononukleárními buňkami stimulovanými PWM a PWM+ConA metodou RayBio u pacienta s inhibicí tvorby imunoglobulinů

Membrána byla 30 min inkubována v blokačním médiu, a poté byl aplikován 1ml vzorku. Po 1 – 2 hodinové inkubaci při pokojové teplotě došlo k vyvázání cytokinů přítomných ve vzorkách na protilátky navázané na membráně. Membrána byla promyta promývacím roztokem, a poté byly přidány primární protilátky konjugované s biotinem. Po 1-2 hodinové inkubaci při pokojové teplotě byla membrána opět promyta. Poté byl aplikován streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou a membrána byla inkubována přes noc při 4⁰C. Po promytí byla přidána směs dvou detekčních pufrů a membrány byly vloženy do luminiscenčního přístroje LAF-1000 na Fyziologickém ústavu ČAV, Praha. V místech, kde

byla navázána peroxidáza, došlo k vyvíjení reakce. Reakce byla snímána v pravidelných časových intervalech (10s, 30s, 60s, 120s) a ukládána do počítače. Snímky byly následně hodnoceny programem LUCIA G.

V Tab. č. 8 jsou uvedeny minimální koncentrace jednotlivých cytokinů zachytitelné touto metodou, tak jak je udává výrobce. Jak je vidět, tak citlivost zachycení jednotlivých cytokinů se liší a není tudíž možné podle velikosti či denzity skvrn porovnat koncentrace různých cytokinů v rámci dané membrány.

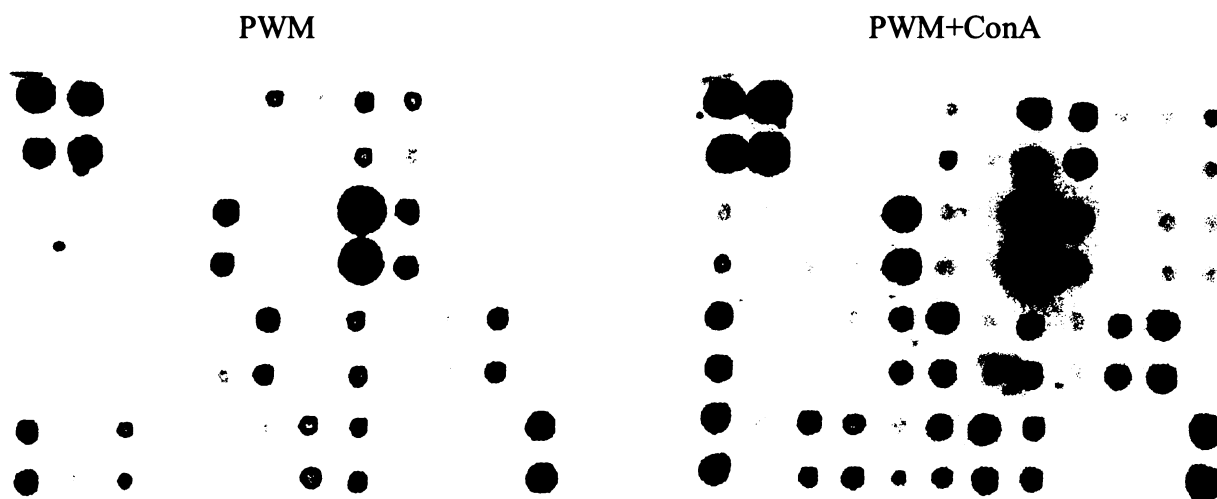
Tabulka č. 8 - Citlivost metody RayBio® Human Cytokine Array

Název	Citlivost (pg/ml)	Název	Citlivost (pg/ml)
IL-1 α	1000	IP-10	10
IL-1 β	100	Eotaxin	1
IL-2	25	GCSF	2000
IL-3	100	GM-CSF	100
IL-4	1	M-CSF	1
IL-6	1	MCP-1	3
IL-7	100	MCP-2	100
IL-8	1	MIP-1 α	20
IL-10	10	MIP-1 β	10
IL-12	1	MIP-1 δ	100
IL-13	100	RANTES	2000
IL-15	100	TGF- β 1	200
IL-16	1	TNF- β	1000
IFN-gama	100		

6.6.9. Využití počítačového programu LUCIA 4.80 ke zhodnocení výsledků metody RayBio®

Metoda RayBio byla hodnocena opět počítačovým programem LUCIA. K hodnocení byly vybrány snímky, u kterých intenzita jasu pozitivních kontrol ještě nedosáhla maximálních hodnot a pozadí snímků bylo co nejsvětlejší (většinou pořízené při 60 s inkubaci). Nejprve byla změřena průměrná hodnota denzity pozadí. Ta byla odečtena od denzity spotů a snímky byly poté upraveny tak, aby denzita pozadí byla na všech snímkách stejná. Při zpracování předloženého materiálu se osvědčila transformace na 92 až 94 % maximálního jasu.

V dalším kroku byla označena místa, která měla být změřena – bylo provedeno tzv. prahování objektů (Obr. č. 17). Práhování bylo nastaveno tak, že měřený objekt měl denzitu



Obrázek č. 17 - Detekce jednotlivých skvrn v metodě RayBio pomocí obrazové analýzy LUCIA (stimulace PWM a PWM+ConA u pacienta bez inhibice IgA a IgG)

minimálně o 7 % vyšší než byla hodnota denzity pozadí. Toto prahování bylo použito na všechny snímky. Prahování proběhlo tedy automaticky, nezávisle na lidském faktoru. Takto byly detekovány spoty, jejichž denzita dosahovala alespoň 2 % z průměrné denzity pozitivních kontrol.

Binární obraz (tzn. prahované objekty) byl poté vyčištěn od artefaktů, byly vyhlazeny obrysy a rozděleny dotýkající se objekty. V upraveném binární obraze byla změřena integrální a střední denzita (= integrální denzita / plocha) jednotlivých objektů.

Na závěr byla hodnocena také přítomnost skvrn, které sice byly na snímkách jasně patrné, ale při prahování nebyly zachyceny, protože jejich denzita byla menší než 7 % denzity pozadí. Po zvýšení kontrastu snímků byla pouze zaznamenána poloha těchto skvrn.

6.6.10. Stanovení koncentrace cytokinů pomocí multiplexové analýzy na přístroji Luminex

Multiplexová analýza xMAPTM představuje nejnovější imunoanalytickou metodu, která se používá k rychlému a přesnému stanovení koncentrace velkého počtu cytokinů (nebo jiných proteinů) v malém vzorku tekutiny (supernatantu, plazmě, séru). Využívá se principu průtokové cytometrie.

V naší studii byla sledována koncentrace cytokinů v supernatantech získaných po 3denní kultivaci mononukleárních buněk s PWM, PWM+ConA a v nestimulované kultuře. Byla použita souprava Flurokine[®] MAP, Human MultiAnalyte Profiling Base Kit A (RD

System, Inc.), pomocí které byly detekovány koncentrace IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , VEGF, MIP-1 α a TPO.

Postup byl prováděn podle návodu v soupravě. Na malé kuličky, které se lišily svým fytochromovým značením, byly nejprve navázány primární protilátky specifické vůči daným cytokinům. Ke kuličkám bylo přidáno 100 μ l supernatantu. Po inkubaci a promytí byla ke vzorkům přidána biotinylovaná protilátka specifická vůči danému cytokinu. Po inkubaci a promytí byl ke vzorku přidán konjugát obsahující Streptavidin-phycoerytrin. Po další inkubaci a promytí byly kuličky naředěny, a poté byly analyzovány přístrojem LUMINEX® 100TM analyzer v HLA laboratoři IKEM, Praha.

6.6.11. Klinické a biochemické laboratorní vyšetření

Ve spolupráci s Laboratoří klinické imunologie a laboratorní diagnostiky a Biochemickou laboratoří ÚKBLD Všeobecné fakultní nemocnice bylo provedeno vyšetření séra pacientů.

V sérech byly stanoveny hladiny cholesterolu, HDL, LDL a triglyceridů na přístroji Modular (Roche). Přítomnost cirkulujících imunokomplexů (CIK) v séru byla stanovena metodou PEG-IKEM a byla měřena na ELISA Readeru MRX II. Hodnoty antifosfolipidových protilátek (APLA izotypu IgG a IgM) byly stanoveny metodou ELISA (Anti-Phospholipid Screen IgG/IgM, ORGENTEC). Fyziologické hodnoty jednotlivých vyšetření jsou uvedeny v Tab. č. 9.

Tabulka č. 9 - Fyziologické normy biochemických a imunologických vyšetření sér

	Norma
Cholesterol	3,83 – 5,8 mmol/l
HDL	Ženy 1,3 – 2,3 mmol/l Muži 1,1 – 2,1 mmol/l
LDL	Ženy 2,2 – 4,5 mmol/l Muži 2,2 – 4,3 mmol/l
Triglyceridy	0,68 – 1,69 mmol/l
Antifosfolipidové (APLA) protilátky IgG	Slabá poz. 10-20 GPL/ml Pozitivita - >20 GPL/ml
Antifosfolipidové (APLA) protilátky IgM	Slabá poz. 10-20 MPL/ml Pozitivita - >20 MPL/ml
Cirkulující imunokomplexy	0 – 90 j

7. VÝSLEDKY

7.1. Experimentální část č. 1

Výsledky této studie jsou součástí publikace Z. Krátká, J. Bártová, O. Krejsa, M. Otčenášková, T. Janatová and J. Dušková - **Interleukin-1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early-onset periodontitis**, která byla zaslána do tisku. Publikace je uvedena na straně 77 - 81.

7.1.1. Výsledky klinické studie

V letech 1991 – 1995 byl ve Výzkumném ústavu stomatologickém sestaven soubor 48 pacientů s diagnózou časná parodontitida (EOP). Na počátku studie byl zánět gingivy nejvýraznější u molárů (stoliček) horní i dolní čelisti, poté u řezáků v horní čelisti a u druhých premolárů (třenových zubů) (Krejsa a spol. 1993, Procházková a spol. 1996, Bártová a spol. 1996). Nejméně byly zasaženy špičáky a první premoláry. Postižení bylo stranově symetrické. Nejčastějšími zuby, u kterých se vyskytly parodontální choboty byly druhé horní moláry, pak první horní moláry, dále druhé horní premoláry a dolní první a druhé moláry.

Rentgenogramy byly hodnoceny z hlediska resorpce alveolární kosti. Mezi stavem při vstupním vyšetření a půl roku po terapii nebyly zjištěny rozdíly (Krejsa a spol. 1993, Procházková a spol. 1996). Resorpce kosti byla minimální převážně horizontálního charakteru.

V průběhu let 1992 – 2005 byl systematicky sledován soubor 20 pacientů (8 mužů a 12 žen), s průměrným vstupním věkem pacientů 19,9 let (od 15 do 26 let). V Tab. č. 10 jsou shrnuty výsledky klinického vyšetření - průměrné hodnoty gingiválního indexu (GI) jsou uvedeny v procentech, stejně jako průměrný počet chobotů hlubokých 4 - 5 mm (PD m) a průměrný počet chobotů hlubších než 5 mm (PD h).

Pacienti byli rozděleni do skupin ve čtvrtém roce léčby na základě progresu onemocnění. **Skupina A** zahrnovala deset pacientů s mírným průběhem onemocnění. Parodontální choboty u nich byly přítomny pouze při vstupním vyšetření nebo ještě po prvním roce léčby. Poté se u pacientů vyskytoval pouze zánět gingivy. **Skupinu B** tvořilo deset pacientů s horším průběhem onemocnění, u kterých byly klinické nálezy poměrně heterogenní. U pěti pacientů došlo k vymizení parodontálních chobotů později díky intenzivní konzervativní terapii nebo použitím chirurgického výkonu. U dvou pacientů parodontální choboty přetrvávaly, ale nedošlo k další progresi onemocnění. U tří pacientů navzdory léčbě

došlo k rychlé progresi onemocnění. V důsledku přítomnosti hlubokých parodontálních chobotů bude u těchto pacientů provedena v nejbližší době extrakce uvolněných zubů.

Tabulka č. 10 - Zhodnocení klinického stavu parodontu u pacientů.

Pacient	Pohlaví	Věk		Vstup	1.rok	4.rok	6.rok	8.rok	10.rok	Skupina
1	Ž	20	GI	57.1	19.6	51.8	12.5	12.5	26.8	A
			PDm	21.4	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	
2	M	15	GI	21.4	19.6	7.1	7.1	8.9	10.7	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
3	Ž	20	GI	32.3	17.0	2.7	2.1	3.0	2.1	A
			PDm	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
4	Ž	15	GI	21.4	1.8	1.8	4.5	4.5	1.8	A
			PDm	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
5	M	22	GI	46.4	32.1	24.1	21.4	21.4	12.5	A
			PDm	3.7	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	
6	Ž	17	GI	33.0	9.8	7.1	15.1	14.2	15.1	A
			PDm	17.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
7	Ž	19	GI	53.6	17.9	23.2	3.6	4.5	4.5	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
8	M	21	GI	32.1	34.8	41.0	37.5	31.2	41.0	A
			PDm	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
9	M	15	GI	21.4	29.5	4.5	12.5	12.5	22.3	A
			PDm	21.4	21.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
10	Ž	24	GI	62.5	48.2	28.6	8.0	33.9	20.5	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
11	Ž	17	GI	69.6	18.8	8.9	32.1	33.9	34.2	B
			PDm	14.3	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	
12	Ž	26	GI	21.4	29.5	46.4	38.4	39.3	48.2	B
			PDm	21.4	14.3	14.3	25.0	17.8	17.8	
13	Ž	17	GI	54.5	22.3	38.4	38.4	29.5	22.5	B
			PDm	7.1	7.1	7.1	3.6	7.1	3.6	
14	M	17	GI	19.6	29.5	32.3	31.3	22.5	25.6	B
			PDm	14.3	21.4	7.1	0.0	0.0	0.0	
15	Ž	18	GI	48.2	26.8	22.3	29.5	29.5	27.7	B
			PDm	21.4	10.7	3.6	3.6	3.6	3.6	
16	Ž	25	GI	78.6	33.0	17.0	24.1	19.6	10.7	B
			PDm	3.6	7.1	3.6	3.6	3.6	0.0	
17	Ž	20	GI	16.0	30.0	33.0	21.4	21.4	21.4	B
			PDm	10.7	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	
18	M	24	GI	80.4	65.2	72.3	65.2	62.5	56.3	B
			PDm	10.7	3.6	7.1	10.7	10.7	17.9	
			PDh						7.1	
19	M	25	GI	58.9	33.0	38.4	41.1	42.0	35.7	B
			PDm	19.2	3.8	11.5	11.5	23.7	20.8	
			PDh			3.8	3.8	7.7	7.7	
20	M	21	GI	44.6	21.4	41.1	24.1	44.6	2.1	B
			PDm	21.4	17.8	17.8	14.2	14.2	0.0	
			PDh				3.6	3.6		

Uveden je věk při vstupním vyšetření, průměrné hodnoty gingiválního indexu (GI) v %, průměrný počet chobotů hlubokých 4-5 mm (PDm) v %, průměrný počet chobotů hlubších než 5 mm (PDh) v %.

Skupina A - pacienti s mírným průběhem onemocnění, Skupina B - pacienti s horším průběhem onemocnění.

V Tab. č. 11 je uveden přehled pacientů podle hodnot CPITN. Při vstupním vyšetření byla hodnota CPITN = 3 zjištěna u sedmi pacientů (35 %) v jednom sextantu, u devíti pacientů (45 %) ve dvou sextantech, u tří pacientů (15 %) ve třech sextantech a u jednoho pacienta (5 %) ve čtyřech sextantech. Po deseti letech studie nebyla u 15 pacientů (75 %) nalezena žádná hodnota CPITN = 3, u dvou pacientů (10 %) byla zjištěna v jednom sextantu, u dvou pacientů (10 %) byla zjištěna ve dvou sextantech a u jednoho pacienta (5 %) ve třech sextantech. V současné době (tj. po 13 letech) má jeden z pacientů (č. 18) postižen již celý parodont.

Tabulka č. 11 - Hodnocení stavu parodontu v průběhu desetileté terapie pomocí CPITN indexů

Pacient	Skupina	Vstup	1rok	4 roky	10 let	Spec. terapie / progrese onem.
Pacienti s lehčí formou onemocnění						
1	A	313101	103111	101111	101111	
2	A	311111	101111	101101	101101	
3	A	303111	101111	101000	101000	
4	A	303111	101000	101000	101101	
5	A	311111	311111	101111	101111	
6	A	313111	101101	101101	101111	
7	A	311111	101101	101101	101000	
8	A	311111	111111	111111	111111	
9	A	313313	313313	101010	111010	
10	A	311111	101111	101101	111101	
Pacienti s těžší formou onemocnění						
11	B	311113	111111	311111	111111	
12	B	313111	313111	313111	313111	Progrese onem.
13	B	311311	301101	301311	301101	
14	B	313111	313111	303111	101111	
15	B	333111	331101	311111	311111	
16	B	311111	301111	301111	101111	Chirurgický výkon
17	B	130313	111111	131111	111111	
18	B	311111	311111	311111	311131	Progrese onem.
19	B	333111	311111	311111	313113	Progrese onem.
20	B	313101	311111	313111	101111	

Signifikace rozdílů mezi sledovanými skupinami v průměrných hodnotách gingiválního indexu a v počtu parodontálních chobotů o hloubce 4-5 mm byla zjišťována pomocí

nepárového Studentova t-testu při hladině významnosti $p = 0,05$ (Tab. č. 2 v publikaci). Signifikantně vyšší průměrné počty parodontálních chobotů byly zjištěny ve čtvrtém až desátém roce u skupiny B (pacienti s horším průběhem onemocnění) než u skupiny A (pacienti s lehčím průběhem onemocnění). V šestém a osmém roce studie byly zjištěny signifikantně vyšší hodnoty gingiválního indexu (GI) u skupiny B než u skupiny A.

Závěry: Skupina 20 pacientů s časnou parodontitidou byla ve Výzkumném ústavu stomatologickém klinicky sledována po dobu minimálně deseti let. Včas zahájená konzervativní terapie a pečlivá péče u chrup zpomalila progresi onemocnění u většiny mladých pacientů. Za tuto dobu došlo ke stabilizaci onemocnění a ke zlepšení stavu parodontu u 15 osob a naopak stejný stav parodontu a nebo progresse onemocnění navzdory terapii byla zjištěna u pěti osob. Pacienti byli po čtyřech letech léčby rozděleni na skupinu pacientů s lehčím průběhem onemocnění (skupinu A) a pacienty s horším průběhem onemocnění (skupina B). Signifikantně vyšší hodnoty průměrného počtu parodontálních chobotů a signifikantně vyšší hodnoty průměrného gingiválního indexu byly zjištěny u pacientů skupiny B než u pacientů skupiny A.

7.1.2. Výsledky mikrobiologické studie

Přítomnost bakterie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) byla na počátku a v průběhu terapie zachycena v sulkulární tekutině pacientů a zdravých sourozenců kultivační metodou. Přítomnost *A. a.* byla podmínkou zařazení pacientů do studie.

Metodou reverzní hybridizace bylo na konci studie vyšetřeno 16 pacientů ze základního souboru. Z Tabulky č. 5, která je součástí publikace, vyplývá, že *T. denticola* byla zjištěna u 13 pacientů (81,3 %), *P. gingivalis* u deseti pacientů (62,5 %), *P. intermedia* u sedmi pacientů (43,8 %), *A. a.* u osmi pacientů (50 %) a *T. forsythia* u pěti pacientů (31,3 %). U dvou pacientů (12,5 %) nebyla zachycena žádná z vyšetřovaných bakterií.

U pacientů s mírnou formou onemocnění (skupina A) byly metodou hybridizace DNA detekovány hlavně *T. denticola* a *A. a.*. Naopak u pacientů s progresivní formou onemocnění (skupina B) byly detekovány hlavně *T. denticola* a *P. gingivalis*.

Závěry: Na počátku a v průběhu léčby pacientů byla z jejich sulkulární tekutiny kultivována bakterie *A. a.*. Metodou hybridizace DNA byly ve vzorcích sulkulární tekutiny zjištěny u pacientů další patogenní bakterie. Zatímco u pacientů s lehčí formou onemocnění se

vyskytovaly hlavně *A. a.* a *T. denticola*, u pacientů s horší formou onemocnění se vyskytovaly převážně *P. gingivalis* a *T. denticola*.

7.1.3. Vyšetření polymorfismu IL-1A a IL-1B genů

Metodou hybridizace DNA byla provedena u 20 osob genetická analýza přítomnosti jednotlivých alel pro IL-1A a IL-1B. Výsledky jsou uvedeny v Tab. č. 3, která je součástí publikace.

Riziková alela-2 genu IL-1A (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici -889) byla detekována 14 pacientů (70 %), riziková alela-2 genu IL-1B (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici +3954) byla nalezena u 13 pacientů (65 %). IL-1 kombinovaný genotyp, tj. přítomnost obou rizikových alel-2, byl nalezen u 12 pacientů (60 %). Žádná riziková alela nebyla zjištěna u pěti pacientů (25 %). Gen HLA-DR4 byl zjištěn pouze u jednoho pacienta (6,3 %) ze 16 vyšetřovaných osob.

Pomocí nepárového Studentova t-testu při hladině významnosti $p=0,05$ byly zjišťovány rozdíly v klinickém stavu u pacientů s rizikovým a nebo nerizikovým genotypem. Mezi těmito skupinami nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly (Tab. č. 4 v publikaci), přesto vyšší výskyt IL-1 rizikového genotypu byl detekován u pacientů s horším průběhem onemocnění (pacienti skupiny B) než u pacientů s mírnou formou onemocnění (skupina A).

Závěry: U 60 % pacientů s časnou parodontitidou byl zjištěn IL-1 kombinovaný genotyp, který je rizikový z hlediska progresu onemocnění. Jeho vyšší výskyt byl detekován u pacientů s horším průběhem onemocnění (pacienti skupiny B) než u pacientů s mírnou formou onemocnění (skupina A), avšak rozdíly nebyly statisticky průkazné.

7.1.4. *Interleukin-1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early-onset periodontitis*

Interleukin-1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early-onset periodontitis

Zuzana Krátká ^{CA}, Jiřina Bártová, Otakar Krejsa, Martina Otčenášková, Taťjana Janatová and Jana Dušková

Institute of Dental Research, 1st Faculty of Medicine and General University Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic

Keywords: Early-onset periodontitis, longitudinal study, IL-1 genotype, dental plaque bacteria, conservative therapy, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Running title: 10-year study of patients with EOP

Abstract

Objectives: A 10-year study of early-onset periodontitis (EOP) patients, including clinical observation, analysis of genetic polymorphism of IL-1A and IL-1B genes and microbiological characteristics.

Material & Methods: 20 patients (age 15 – 26 years) with at least one periodontal pocket (PD \geq 3 mm, mean 12.9 ± 6.9), inflammation of gingiva (mean Gingival Index 43.6 ± 20.4) and the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) were treated conservatively. The risk IL-1A allele-2 and IL-1B allele-2 genome and bacterial presence were analyzed with hybridization DNA methods.

Results: Patients were divided according to the clinical status in the 4th year of study into group A (GI 19.2 ± 17.5 , no PD $>$ 3 mm) and group B (GI = 35.0 ± 17.5 , PD $>$ 3 mm = 8.0 ± 5.9). Significant differences in PD and GI were found between groups during the whole study. No periodontal pockets were detected in 15 patients in the 10th year. A progression of disease was found in three patients.

The risk IL-1 composite genome was detected in 12 patients (60 %). *T. denticola* was detected in 13, *P. gingivalis* in 10, *P. intermedia* in 7, *A. a.* in 8 and *T. forsythia* in 5 patients.

Conclusion: EOP may, but need not, develop into its aggressive form. Early finding of the disease followed by conservative therapy could positively influence the disease progression.

Introduction

Early-onset periodontitis (EOP) occurs in puberty in otherwise healthy patients. The permanent incisors and first molars are affected by severe attachment loss and bone destruction (AAP, 1989). EOP is associated with the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) in the gingival crevice area (Slots 1979, Zambon 1983). Other pathogenic bacteria, *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*), *Prevotella intermedia* (*P. i.*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. n.*) and *Treponema denticola* (*T. d.*) were also detected in EOP patients (Albandar et al. 1997, Kamma et al. 2004). The main objective of therapy is to change the subgingival environment and thus reestablish, by mechanical treatment – scaling and root planing, a microbial flora compatible with health (Badersten et al. 1984, Van der Velden et al., 2003). Epidemiological studies have shown that the progression of the disease is not linear and continuous (Page 1999). Only 3 – 10 % of affected localities became worse during the time, 90 % of localities were stable. In approximately 5 % of population the progression of the disease is fast and affects many localities.

EOP patients often show familial patterns and genetic factors are implicated in both the pathogenesis and the susceptibility to the disease (Kinane 2003). The IL-1 genotype is the most thoroughly investigated polymorphism in relation to periodontitis. Kornman et al (1997) reported that the combined presence of the allele-2 of the IL-1A gene (C \rightarrow T nucleotide exchange at position -889)

and allele-2 of the IL-1B gene (C → T nucleotide exchange at position +3953) was associated with the severity of periodontitis in non-smoking Caucasian patients. This combined carriage rate of the alleles-2 was designed the IL-1 composite genotype (Kornman et al. 1997).

The first marks of the development of periodontal disease have been shown in early adult age. As Tanner et al. (2005) showed, early-onset periodontitis treated in early stages was associated only with gingival inflammation and a minimal attachment loss.

Our present study concerns a group of 20 microbiologically and genetically examined patients who had completed active periodontal treatment followed by a 10-year conservative therapy. Analysis of IL-1 composite genome and of the presence of pathogenic bacteria in patients was performed using hybridization methods. We assessed the effect of the genetically predetermined competence in connection with the active periodontal treatment, the progression of the disease and the bacterial infection.

Material and methods

Subjects

Twenty patients (7 males and 13 females, aged 15 - 26) generally healthy with EOP were enrolled in the study. The patients have been regularly clinically and immunologically examined at the Institute of Dental Research, Prague, Czech Republic for more than 10 years. They met the basic clinical diagnosis criterion – the presence at least one periodontal pocket deeper than 3 mm situated in the region of the molars or incisors, inflammation of gingiva and the presence of *A. a.* in the sulcular region. Persons with systemic disease or pregnant women were excluded from the group of patients. In agreement with Helsinki convention (2002), informed consent for blood collection for genetic examination was obtained from all examined persons.

Clinical examination

To be maximally objective, all clinical measurements were made by one practitioner. The level of gingival inflammation was determined by the gingival index, which was determined at 4 sites per each tooth. Pocket depth measurements were recorded with WHO manual probe at 4 sites per each tooth and by X-ray. This was followed immediately by conservative treatment. The dental calculus was removed, unsatisfactory fillings or crowns were restored and correct tooth brushing technique was demonstrated. All patients were thoroughly instructed in oral hygiene including teeth cleaning and gingival massage. The conservative part of the therapy lasted 4 weeks and was followed by a 10-day tetracycline treatment. Two weeks after the therapy the patients were invited for a control clinical examination, with further check-ups at 3 and then 6 month intervals. Patients who responded satisfactorily to this initial non-surgical treatment were then invited twice a year for a control clinical and immunological examination. Some of the patients needed more frequent treatment which included scaling and root planing, periodontal surgery, local delivery of antimicrobials or systemic antibiotics such as tetracycline.

To evaluate whether the baseline clinical and immunological findings could be indicative of disease progression and satisfactory healing, the patients were retrospectively divided into groups as follows: The patients who responded well to initial conservative therapy formed group A, patients who needed more treatment or surgery formed group B.

Analysis of IL-1 genotype using the PeriodontitisPlus kit (GenID[®] GmbH) and Genotype[®] PST test (Hain Lifescience)

The DNA was isolated from EDTA - whole blood using the QIAmp, QIA-gene kit and quantified using the Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) on 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

The detection of both allele-1 and allele-2 of both genes IL-1A and IL-1B was done using the Genotype PST test, while the presence of only risk alleles-2 of both genes IL-1A and IL-1B was detected using the PeriodontitisPlus assay. The procedure was the same in both assays.

The regions of IL-1A allele-2 (C→T nucleotide exchange at the position -889) and IL-B allele-2 (C→T nucleotide exchange at the position +3953) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with PN-IL1+ amplify (PeriodontitisPlus) or PN mix (GenoType). The amplicons were characterized by a reverse hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP), which were immobilized on nitrocellulose strips. During the hybridization, the denatured amplified DNA was bound to the gene probes attached to the strips. Then streptavidine-coupled alkaline phosphatase was bound to the hybrids of the gene probe and biotin-labeled amplified DNA. This complex was then detected by a color reaction of NBT/BCIP with alkaline phosphatase. The reaction was stopped using distilled water. The band pattern was analyzed using the template supplied.

Detection of periodontal marker bacteria using the PeriodontitisPlus kit (GenID[®] GmbH)

Nitrocellulose chips microDent[®] were used for sterile sampling of sulcular fluid from the periodontal pockets or healthy sulcus of patients and their healthy siblings. The bacterial DNA was isolated by DNeasy Tissue Kit (Qiagen). The isolated DNA was amplified with sequence specific biotin-labeled primers fragments of special genes of *A. a.*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* and *T. denticola*. The amplicons were detected in the same way and simultaneously with amplicons of IL-1A and IL-1B alleles by hybridization reaction (see *Analysis of IL-1 genotype...*), so we detected both bacterial and interleukin positive findings on one strip.

Statistical evaluation

Student's non parametric t-test at a probability level of $p=0.001$, $p=0.01$ and $p=0.05$ was used to evaluate significant differences between the groups of patients. As a low number of patients was included into the study, we prefer to compare the original data to using statistical evaluation.

Results

Clinical examination

Table 1 shows the clinical results before and during the 10-year period. It includes data found at the baseline, then after 1 year of the intensive periodontal treatment, and then after 4, 6, 8 and 10 years. The data involve the sex of patients, age at which the periodontal disease was diagnosed, the gingival indices (GI), the percentage of mild periodontal pockets 3 – 4 mm ($PD \geq 3$ mm) and the percentage of deep periodontal pockets ≥ 5 mm ($PD \geq 5$ mm).

As mentioned above, the patients were divided into two groups according to the presence of mild periodontal pockets after the first year of the study. Group A contained 10 patients in whom periodontal pockets ($PD \geq 3$ mm) were detected only in the first year of therapy, but no periodontal pocket and only mild inflammation of gingiva were detected in the subsequent years. Group B contained 10 patients in whom at least 1 periodontal pocket ($PD \geq 3$ mm) and inflammation of gingiva persisted for more than 1 year. The state of the periodontium was improved in 5 patients later during the studied period, but in 5 other patients the disease strongly progressed. In two of them the surgical treatment (No.16) or vector treatment (No. 20) were successful and stopped the progression of the disease, while in three patients (No. 12, 18, 19) the disease has been very progressive and extraction of some teeth seems to be necessary.

The average number of teeth was 27.8 ± 0.5 . The clinical findings of different groups were compared using non-paired Student t-test. As shown in Table 2, the mean gingival indices (%) were significantly increased in group B when compared with group A in the 6th and 8th year of the study. The mean numbers of sites with the probing depth 4-5 mm were significantly higher in group B than in group A in the 4th, 6th, 8th and 10th year of the study. Deep periodontal pockets with $PD > 5$ mm were detected only in 3 of patients.

Detection of the IL-1 polymorphisms

The presence of IL-1A-889 and IL-1B+3954 alleles was determined using two different kits. Periodontitis Plus kit was able to identify only the presence of IL-1A allele-2 and IL-1B allele-2. The Genotype PST test was able to detect the presence of both allele-1 and allele-2 of IL-1A or IL-1B.

The analysis of IL-1 genes is shown in Table 3. The risk alleles-2 for IL-1A-889 were present in 6 patients of group A and 8 patients of group B. The risk alleles-2 of IL-1B+3954 were found in 5 patients of the group A and 8 patients of the group B. The risk IL-1 composite genome, which was characterized as a combined presence of allele-2 of IL-1A-889 and allele-2 of IL-1B +3954, was detected in 5 patients of group A and 7 patients of group B. None of the studied risk alleles were detected in 4 patients of group A and one patient of group B. Even though the results are not statistically significant, a higher occurrence of risk IL-1 composite genome was detected in the group of patients with progressive form of periodontitis (group B).

The non-parametric Student's t-test was used to analyze whether there are any clinical differences between the group of patients with IL-1 composite genome ("Risk") and the group of patients without

IL-1 composite genome ("Non-risk"). The results are summarized in Table 4. Higher values of gingival indices and a higher number of periodontal pockets were detected in the group of patients with the IL-1 composite genome, but the differences were not significant.

Detection of periodontal marker bacteria

The presence of *A. a.* in the sulcular fluids of patients was detected by cultivation on specific TSBV agar in all of examined patients in the preliminary study and during the follow-up study (Bártová et al. 2000). At the end of the study, the bacteria were detected in the sulcular fluid of 16 patients using the method of reverse hybridization of DNA and specific binding to the gene probes attached on the strips (PeriodontitisPlus). As shown in Table 5, *T. denticola* was detected in 13 patients (81.3 %), *P. gingivalis* in 10 patients (62.5 %), *P. intermedia* in 7 patients (43.8 %), *A. a.* in 8 patients (50 %) and *T. forsythia* in 5 patients (31.3 %). Two patients did not harbor any of the monitored bacteria.

Discussion

The results of epidemiological studies on the patients with periodontitis suggest that a variety of risk factors may predispose individuals to periodontitis. They also indicate the existence of the genetically predetermined high risk groups (Heitz-Mayfield, 2005; Loos et al. 2005). Risk factors for moderate to severe periodontitis include cigarette smoking, advanced age, diabetes mellitus and the presence of specific bacteria. Periodontitis frequently begins in the youth and early adulthood, rather than in the older years. It was hypothesized that the more susceptible members of the population are those in whom periodontitis begins in the youth (Page, 1999). Periodontitis, when treated in the early stages, can be associated only with gingival inflammation and only low attachment loss (Tanner et al., 2005). Regular supportive periodontal care is effective in improving clinical and microbiological findings (Kamma and Baehni 2003, Tanner et al. 2005). Only a low number of early-onset periodontitis patients have exhibited a rapid progression of the disease, which could be classified as aggressive periodontitis (Attström and Van der Velden 1994).

Thirteen years ago a group of 47 patients with EOP was collected from a set of 9225 young people (16-19 years) at the Institute of Dental Research. Twenty of them have been treated there until now. At the baseline of the follow-up study, all patients had at least one periodontal pocket deeper than 3 mm, inflammation of the gingiva and *A. a.* detected in the sulcular area. No periodontal pockets were detected after the first year of therapy in ten patients and after the 10-year therapy in another 5 patients. This means that the conservative therapy and adequate oral hygiene bring about an improvement of the gum tissue.

To start this therapy as early as possible, a number of clinical factors assessed at the patient level such as bleeding on probing and probing depth equal to 6 mm or greater at re-evaluation can be used to identify patients at risk for disease progression (Tonetti and Claffey 2005). Such serious progression of disease was detected in two of our EOP patients, who had periodontal pockets in 32.1 % and 28.5 %

of teeth respectively and extraction of the teeth has been considered. They have a very serious prognosis of further pathology progression because of their young age (31 and 32 years). The results of genetic and microbiological assays showed that they possessed the IL-1 composite genome, and revealed the presence of *A. a.* in periodontal pockets. In our previous study we found in these patients also a decreased function of polymorphonuclear cells (Procházková et al. 1995). Fortunately, both patients are non-smokers since the progression of the disease could be even more serious in case they would start smoking.

Although some other studies have demonstrated a causal link between genetic polymorphisms and periodontitis, the data are inconclusive. There is considerable racial variability in the prevalence of the composite IL-1 genotype. While the IL-1 gene polymorphism is present in approximately 36 % of Europeans, it is less prevalent in certain races or ethnicity groups (Armitage et al. 2000, Anusaksathien et al. 2003).

Two different assays were used for the genotype screening. The PeriodontitisPlus assay only allowed the detection of risk alleles of IL-1 genotype, while Genotype PST test detected both risk and non-risk alleles of IL-1. However, the PeriodontitisPlus kit also allowed the analysis of the presence of pathogenic bacteria. The results of our study document that the prevalence of composite IL-1 genome was 60 % in the group of EOP patients. While the allele 2 has been linked with severe disease in adults, it is allele 1 that has been found to be more prevalent in subjects with early-onset periodontitis (Diehl et al. 1999, Parkhill et al. 2000). We confirmed these results by detecting allele-1 for IL-1A in 81.3 % of EOP patients and allele-1 of IL-1B in 87.5 % of EOP patients.

As stated by Socransky et al. (2000), patients with the IL-1 composite genotype harbor more often putative periodontal pathogens and have increased counts of these pathogens in terms of both their spectrum and doses. Our results also confirmed the key role of the host-bacterium interplay in the disease onset and/or its progression. Patients without the IL-1 composite genome harbor in the sulcular area 0 - 2 species of pathogenic bacteria, whereas patients with the IL-1 composite genome harbor 0 - 5 species (mean 3.2 species) of pathogenic bacteria. We must realize that not only the presence of bacteria but especially their quantity plays a role in the pathogenesis of the disease (Socransky et al. 2000).

The presence of the IL-1 composite genome may induce pleiotropic effects on various patients' clinical parameters, some of them connected with the periodontal disease. Lang et al. (2000) detected a significant increase in the prevalence of bleeding on probing in IL-1 genome positive patients. We detected higher values of gingival indices and a higher number of periodontal pockets (4-5 mm deep) in patients with the IL-1 composite genome, but the differences were not significant.

A lower function of polymorphonuclear cells was reported at the baseline of our study (Procházková et al., 1995) and a significantly higher IL-4 production and significantly lower IFN-gamma production was reported after *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells with

E. coli and *A. a.* (Bártová et al., 2000). In a recent study (to be published) we paid attention to the role of the IL-1 composite genotype in the regulation of the immune response.

In conclusion, while the evidence for increased susceptibility of individuals with positive IL-1 genotype to periodontitis and disease progression is inconclusive to date, genotyping may help to identify individuals at risk in the future (Heitz-Mayfield, 2005). While the IL-1 genotype is the most thoroughly investigated polymorphism in relation to periodontitis, other genotypes have been reported to be associated with susceptibility to periodontitis (Loss et al. 2005, Holla et al 2004).

Early-onset periodontitis may, but need not, develop an aggressive form. Screening examination of young people could detect patients before the progression of the disease. Well-timed detection of the disease followed by the conservative therapy could positively influence the future of the periodontium.

Acknowledgments

This research was supported by grant IGA NR 8356-3 of the Czech Ministry of Health. The authors gratefully acknowledge the assistance Jarmila Procházková M.D., in the treatment of some of the examined patients.

References

- AAP (The American Academy of Periodontology) (1989) Consensus report on periodontal diagnosis and diagnostic aids. *Proceedings of the Workshop in Clinical Periodontics*. Chicago: American Academy of Periodontology 1, 23-31:31.
- Agarwal, S., Suzuki, J. B. & Riccelli, A. E. (1994) Role of cytokines in the modulation of neutrophil chemotaxis in localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **29**, 127-137.
- Albandar, J. J., Brown, L. J. & Løe, H. (1997) Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **68**, 973-981.
- Anusaksathien, O., Sukboon, A., Sitthiphong, P. & Teanpaisan, R. (2003) Distribution of interleukin-1beta (+3954) and IL-1alpha (-889) genetic variations in a Thai population group. *Journal of Periodontology* **74**, 1796-1802.
- Armitage, G. C., Wu, Y., Wang, H. Y., Sorrell, J., di Giovine, F. S. & Duff, G. W. (2000) Low prevalence of a periodontitis-associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *Journal of Periodontology* **71**, 164-171.
- Attström, R. & van der Valden, U. (1994) Consensus report on epidemiology. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. p. 120, London. Quintessence.

- Badersten, A., Nilvéus, R. & Egelberg, J. (1984) Effect of nonsurgical periodontal therapy (II). Severely advanced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **11**, 63-76.
- Bártová, J., Krátká, Z., Procházková J., Krejsa, O., Dušková, J., Mrklas L., Tlaskalová, H. & Cukrowská, B. (2000) Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators of Inflammation* **9**, 115-120.
- Diehl, S. R., Wang, Y., Brooks, C. N., Burmeister, J. A., Califano, J. V., Wang, S. & Schenkein, H. A. (1999) Linkage disequilibrium of interleukin -1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology* **70**, 418-430.
- Gore, E., Sanders, J. J., Pandey, J. P., Palesch, Y. & Galbraith, G. M. (1998) Interleukin -1beta +3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 781-785.
- Heitz-Mayfield, L. J. A. (2005) Disease progression: identification of high -risk groups and individuals for periodontitis . *Journal of Clinical Periodontology* **32** (Suppl.6), 196-209.
- Holla, L. I., Fassmann, A., Stejskalova, A., Znojil, V., Vanek, J. & Vacha, J. (2004) Analysis of the interleukin – 6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* **75**, 30-36.
- Kamma, J.J., Baehni, P.C. (2003) Five-year maintenance follow-up of early-onset periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 562-72.
- Kamma, J.J., Nakou, M., Gmur, R., Baehni P.C. (2004) Microbiological profile of early-onset / aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, **19**, 314-21.
- Kinane, D. F. (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**, 430-449.
- Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G. J., Higginbottom, F. L. & Duff, G. W. (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Periodontology 2000* **14**, 33-53.
- Lang, N. P., Tonetti, M. S., Suter, J., Sorrell, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000) Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of Periodontal Research* **35**, 102-107.
- Loos, B. G., John, R. P. & Laine, M. L. (2005) Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *Journal of Clinical Periodontology* **32** (Suppl. 6), 159-179.
- McDevitt, M. J., Wang, H. Y., Knobelmann, C., Newman, M. G., di Giovine, F. S., Timms, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000) Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice . *Journal of Periodontology* **71**, 156-163.

- Meisel, P., Schwahn, C., Gesch, D., Bernhardt, O., John, U. & Kocher, T. (2004) Dose-effect relation of smoking and the interleukin-1 gene polymorphism in periodontal disease. *Journal of Periodontology* **75**, 236-242.
- Page, R. C. (1999) Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *Journal of Periodontal Research* **34**, 331-339.
- Papapanou, P. N., Neiderud, A. M., Sandros, J. & Dahlen, G. (2001) Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. *Journal of Clinical Periodontology* **28**, 389-396.
- Parkhill, J. M., Hennig, B. J., Chapple, I. L., Heasman, P. A. & Taylor, J. J. (2000) Association of interleukin -1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 682-689.
- Procházková, J., Bártová, J., Krejza, O., Šmauzová, R., Dušková, J., Mrklas, L. (1995) Changes in neutrophil function in patients with early onset periodontitis according to the family occurrence of the disease. In *Advances in Mucosal Immunology, Part B*. pp. 1127 – 1129. New York, London. Plenum Press.
- Sigusch, B., Klinger, G., Glockmann, E. & Simon, H. U. (1998) Early-onset and adult periodontitis associated with abnormal cytokine production by activated T lymphocytes. *Journal of Periodontology* **69**, 1098-1104.
- Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* **15**, 606-609.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. & Duff, G. W. (2000) Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 810-818.
- Tanner, A.C., Kent, R. Jr, Van Dyke, T., Sonis, S.T., Murray, L.A. (2005) Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *Journal of Periodontology* **76**, 573-81.
- Tonetti, M. S., Claffey, N. & on behalf of the European Workshop in Periodontology group C (2005) Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *Journal of Clinical Periodontology* **32** (Suppl.6), 210-213.
- Van der Velden, U., Varoufaki, A., Hutter, J.W., Xu, L., Timmerman, M.F., Van Winkelhoff, A.J., Loos, B.G. (2003) Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology* **30**, 603-10.
- Van Dyke, T. E., Schweinebraten M, Cianciola, L. J., Offenbacher, S. & Genco, R. J. (1985) Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **20**, 503-514.

Zambon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. (1983) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: prevalence in patients groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *Journal of Periodontology* 54, 707-711.

Table 1. – Classification of patients according to their periodontal fitness - gingival indices (GI %), mild periodontal pockets [PDm 4-5 mm] (%), deep periodontal pockets [PDd > 5 mm] (%)

Patient	Sex	Age		Start	1 st year	4 th year	6 th year	8 th year	10 th year	Group
1	F	20	GI	57.1	19.6	51.8	12.5	12.5	26.8	A
			PDm	21.4	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	
2	M	15	GI	21.4	19.6	7.1	7.1	8.9	10.7	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
3	F	20	GI	32.3	17.0	2.7	2.1	3.0	2.1	A
			PDm	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
4	F	15	GI	21.4	1.8	1.8	4.5	4.5	1.8	A
			PDm	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
5	M	22	GI	46.4	32.1	24.1	21.4	21.4	12.5	A
			PDm	3.7	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	
6	F	17	GI	33.0	9.8	7.1	15.1	14.2	15.1	A
			PDm	17.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
7	F	19	GI	53.6	17.9	23.2	3.6	4.5	4.5	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
8	M	21	GI	32.1	34.8	41.0	37.5	31.2	41.0	A
			PDm	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
9	M	15	GI	21.4	29.5	4.5	12.5	12.5	22.3	A
			PDm	21.4	21.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
10	F	24	GI	62.5	48.2	28.6	8.0	33.9	20.5	A
			PDm	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
11	F	17	GI	69.6	18.8	8.9	32.1	33.9	34.2	B
			PDm	14.3	0.0	0.0	3.6	0.0	0.0	
12	F	26	GI	21.4	29.5	46.4	38.4	39.3	48.2	B
			PDm	21.4	14.3	14.3	25.0	17.8	17.8	
13	F	17	GI	54.5	22.3	38.4	38.4	29.5	22.5	B
			PDm	7.1	7.1	7.1	3.6	7.1	3.6	
14	M	17	GI	19.6	29.5	32.3	31.3	22.5	25.6	B
			PDm	14.3	21.4	7.1	0.0	0.0	0.0	
15	F	18	GI	48.2	26.8	22.3	29.5	29.5	27.7	B
			PDm	21.4	10.7	3.6	3.6	3.6	3.6	
16	F	25	GI	78.6	33.0	17.0	24.1	19.6	10.7	B
			PDm	3.6	7.1	3.6	3.6	3.6	0.0	
17	F	20	GI	16.0	30.0	33.0	21.4	21.4	21.4	B
			PDm	10.7	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	
18	M	24	GI	80.4	65.2	72.3	65.2	62.5	56.3	B
			PDm	10.7	3.6	7.1	10.7	10.7	17.9	
			PDd						7.1	
19	M	25	GI	58.9	33.0	38.4	41.1	42.0	35.7	B
			PDm	19.2	3.8	11.5	11.5	23.7	20.8	
			PDd			3.8	3.8	7.7	7.7	
20	M	21	GI	44.6	21.4	41.1	24.1	44.6	2.1	B
			PDm	21.4	17.8	17.8	14.2	14.2	0.0	
			PDd				3.6	3.6		

Group A – patients without periodontal pockets in the 4th year of study

Group B – patients with periodontal pockets in the 4th year of study

Table 2. Clinical characteristics of groups clustered according to the disease progression during longitudinal monitoring

	Group	0	1 st year	4 st year	6 th year	8 th year	10 th year
Gingival index	A	38.1 ^{a)} (15.6)	23.0 (13.4)	19.2 (17.5)	12.4 (10.6)***	14.7 (10.9)**	15.7 (12.3)
	B	49.2 (15.6)	31.0 (13.0)	35.0 (17.5)	34.6 (12.7)***	34.5 (13.1)**	28.3 (16.4)
Probing depth 4-5 mm	A	11.4 (7.5)	2.9 (6.7)	0.0 (0.0)***	0.0 (0.0)**	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*
	B	14.4 (6.4)	8.6 (7.3)	8.0 (5.9)***	8.3 (8.5)**	9.1 (10.2)*	7.9 (11.4)*

^{a)} Mean % (standard deviation)

Significant differences within the groups A and B (non-parametric Student's t-test) *p<0.05, ** p<0.01

*** p<0.001

Table 3. The analysis of IL-1A and IL-1B polymorphisms

Patient	Group	IL-1A		IL-1B		IL-1 composite genome	
		Allele-1	Allele-2	Allele-1	Allele-2		
1	A	+	+	+	+	Composite genome	
2	A	+	-	+	-	No risk allele	
3	A	+	-	+	-	No risk allele	
4	A	+	+	+	+	Composite genome	
5	A	n. t.	+	n. t.	+	Composite genome	
6	A	n. t.	+	n. t.	+	Composite genome	
7	A	+	-	+	-	No risk allele	
8	A	n. t.	+	n. t.	+	Composite genome	
9	A	+	-	+	-	No risk allele	
10	A	+	+	+	-	1 risk allele	
Average of Group A (%)		100	60.0	100	50.0	Composite genome (%)	50.0
11	B	+	+	+	+	Composite genome	
12	B	+	-	+	-	No risk allele	
13	B	+	+	+	-	1 risk allele	
14	B	-	+	-	+	Composite genome	
15	B	+	-	+	+	1 risk allele	
16	B	-	+	-	+	Composite genome	
17	B	n. t.	+	n. t.	+	Composite genome	
18	B	+	+	+	+	Composite genome	
19	B	-	+	+	+	Composite genome	
20	B	+	+	+	+	Composite genome	
Average of Group B (%)		66.7	80.0	77.8	80.0	Composite genome (%)	70.0
Average of Groups A+B (%)		81.3	70.0	87.5	65.0	Composite genome Groups A+B (%)	60.0

Risk IL-1A gene allele-2 has C → T nucleotide exchange at position -889,

Risk IL-1B gene allele-2 has C → T nucleotide exchange at position +3953

IL-1 composite genome – combination of allele-2 of IL-1A and allele-2 of IL-1B

+ detection, - not detected, n. t. not tested

Table 4. Clinical findings of groups clustered according to the detection of risk and non-risk alleles of IL-1A and IL-1B genes

	IL-1A / IL-1B	0	1 st year	4 st year	6 th year	8 th year	10 th year
Gingival index	Risk	46.5 ^{a)} (23.7)	27.0 (16.4)	31.3 (21.2)	28.1 (16.5)	28.1 (16.8)	24.5 (16.9)
	Non-Risk	40.1 (16.2)	27.0 (9.7)	21.9 (15.1)	17.9 (14.5)	20.1 (13.5)	19.0 (14.0)
Probing depth ≥ 3 mm	Risk	14.7 (5.2)	5.2 (7.5)	5.0 (6.4)	4.6 (6.7)	5.7 (10.1)	4.9 (10.8)
	Non-Risk	10.7 (8.3)	6.4 (7.7)	2.8 (5.0)	3.6 (8.1)	3.2 (6.0)	2.8 (5.8)

^{a)} Mean % (standard deviation)

No significant differences were found within the groups with and without the risk IL-1 composite genotype (non-parametric Student's t-test).

Table 5. Detection of periodontal marker bacteria by Periodontitis Plus pack

Patient	Group	Bacteria				
		<i>A. a.</i>	<i>P. g.</i>	<i>P. i.</i>	<i>T. f.</i>	<i>T. d.</i>
1	A	+	+	+	+	+
2	A	-	+	-	-	+
3	A	n. t.				
4	A	n. t.				
5	A	+	+	+	-	+
6	A	+	-	-	-	-
7	A	+	-	-	+	+
8	A	+	+	+	+	+
9	A	-	-	+	-	+
10	A	-	-	-	-	-
Positive detection (%)		62.5	50.0	50.0	37.5	75.0
11	B	-	+	-	-	+
12	B	-	+	+	-	+
13	B	n. t.				
14	B	n. t.				
15	B	+	+	+	-	+
16	B	-	+	-	-	+
17	B	-	-	-	-	-
18	B	+	+	-	+	+
19	B	+	-	+	-	+
20	B	-	+	-	+	+
Positive detection (%)		37.5	75.0	37.5	25.0	87.5
Average A+B (%)		50.0	62.5	43.8	31.3	81.3

+ detection, - not detected, n. t. not tested

7.2. Experimentální část č. 2

7.2.1. Funkce neutrofilních granulocytů

Metabolickou aktivitu neutrofilních granulocytů jsme zjišťovali pomocí INT testu. Hodnoty indexu metabolického vzplanutí (IMV) jsou uvedeny v Tab. č. 12. Na počátku léčby byly u 18 pacientů (90 %) zjištěny nižší hodnoty IMV než je fyziologická hranice. Fyziologické hodnoty IMV byly zjištěny pouze u dvou pacientů (10 %) (Procházková a spol. 1996).

Tabulka č. 12 - Funkce polymorfonukleárních buněk hodnocená testem INT

Pacient	Skupina	Index metabolického vzplanutí		
		1.rok	6.rok	
1	A	1.56		
2	A	2.60	1.24	↓
3	A	3.66	8.97	↑
4	A	2.28	4.68	↑
5	A	3.03		
6	A	3.83		
7	A	3.42	3.21	↓
8	A	1.31		
9	A	1.79	4.87	↑
10	A	2.74	2.77	↑
IMV index < fyziol.hodnoty		100 %	50 %	
11	B	2.34	2.74	↑
12	B	2.54	4.30	↑
13	B	4.90	8.25	↑
14	B	4.90	4.35	↓
15	B	1.20	3.10	↑
16	B	1.60	4.34	↑
17	B	1.62		
18	B	3.81	3.34	↓
19	B	3.57	2.20	↓
20	B	1.69	2.35	↑
IMV < fyziol.hodnoty		80 %	55 %	
Průměr skupina A+B (%)		90 %	53 %	

Index metabolického vzplanutí (IMV) = průměrná intenzita zbarvení buněk stimulovaných zymosanem / průměrná intenzita zbarvení nestimulovaných buněk. Fyziologické hodnoty se pohybují v rozpětí 4,0 až 6,6.

Při druhém vyšetření došlo k vzestupu (↑) nebo poklesu (↓) hodnot INT indexu vzhledem k prvnímu vyšetření.

Data z prvního roku studie byly laskavě poskytnuty doc. MUDr. J. Procházkovou

Test byl zopakován po pěti letech u 15 pacientů. Fyziologické hodnoty IMV byly zjištěny u pěti pacientů (33 %), nižší hodnoty IMV než je fyziologické rozpětí byly zjištěny u

osmi pacientů (53 %) a vyšší hodnoty IMV byly zjištěny u dvou pacientů (13 %). U deseti pacientů (67 %) došlo ke zvýšení hodnot IMV vzhledem k prvnímu vyšetření, u pěti pacientů (33 %) naopak hodnoty IMV poklesly. Mezi skupinami A a B nebyly zjištěny signifikantní rozdíly.

Závěry: Na počátku terapie byl pomocí testu INT u 90 % pacientů detekován defekt ve funkci neutrofilních granulocytů. Snížená funkce těchto buněk přetrvávala u 53 % pacientů i v šestém roce terapie.

7.3. Experimentální studie č. 3

7.3.1. *Produkce cytokinů a imunoglobulinů po in vitro stimulaci mononukleárních buněk pacientů s EOP a jejich zdravých sourozenců*

Výsledky této studie jsou součástí publikace Bártová J., Krátká Z., Procházková J., Krejsa O., Dušková J., Mrklas L., Tlaskalová H. and Cukrowská B. - **Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. Mediators of Inflammation**, 9, 115-120 (2000). Publikace je uvedena na straně 86-91.

Produkce cytokinů byla sledována v letech 1995 - 1996, tedy čtyři roky po zahájení terapie u pacientů.

Metody:

Mononukleární buňky byly izolované z periferní krve šesti pacientů s časnou parodontitidou a jejich sedmi sourozenců se zdravým parodontem, ale s přítomností *A. a.* v sulku. Buňky byly stimulovány s Pokeweed mitogenem (PWM), s Pokeweed mitogenem a Concanavalinem A (PWM+ConA), *A. a.*, *E. coli*. Supernatanty byly odebírány po 24 a 72 hodinách kultivace. Koncentrace cytokinů IL-4, IL-10 a IFN- γ byla zjišťována metodou ELISA.

Produkce imunoglobulinů byla sledována v supernatantech získaných po 7denní kultivaci mononukleárních buněk s mitogeny a bakteriemi. Koncentrace IgA, IgM a IgG v supernatantech byla stanovena metodou ELISA.

Naměřené hodnoty byly logaritmičsky transformovány. Geometrické průměry byly použity ke zjištění statisticky průkazných rozdílů mezi pacienty a zdravými sourozenci pomocí párového Studentova t-testu při hladině významnosti $p=0,05$.

Výsledky:

Po 24 hodinové stimulaci *E. coli* a *A. a.* byla u pacientů zjištěna signifikantně vyšší hladina IL-4 a signifikantně nižší hladina IFN- γ než u zdravých sourozenců (Tab. č. 1 v publikaci). V produkci IL-10 nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Po 72 hodinách stimulace již nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly mezi skupinami.

Po stimulaci PWM+ConA byla u pacientů zjištěna signifikantně vyšší tvorba IgA než u zdravých sourozenců (Tab. č. 2 v publikaci). Zároveň po stimulaci *E. coli* byla u pacientů zjištěna signifikantně vyšší produkce IgM než u zdravých sourozenců.

Závěry:

V době studie byli pacienti s EOP léčeni již čtvrtým rokem a stav parodontu se u většiny z nich výrazně zlepšil. Přesto byla zjištěna po bakteriální stimulaci signifikantně vyšší produkce IL-4 a signifikantně nižší produkce IFN- γ u pacientů než u jejich zdravých sourozenců.

7.3.2. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings

Short Communication



Mediators of Inflammation, 9(1):5, 2000, 2006

EARLY ONSET PERIODONTITIS (EOP) is a chronic inflammatory periodontal disease with a strong genetic link affecting individuals aged 17 to 25. In the familial studies we tested the hypothesis about the role of Th1 and Th2 cytokines in the pathogenesis of EOP disease. The study involved 6 individuals with EOP disease and their 6 siblings with healthy periodontium. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*), a bacterium typical for EOP, was detected in all people studied. Th1 and Th2 cytokine production was measured after *in vitro* stimulation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated and cultivated for 24 h and 7 days with PWM, *A. a.* or *Escherichia coli*. The levels of IL-4, IFN-gamma, IgA, IgG and IgM were measured by ELISA methods. After *in vitro* stimulation of PBMC, a significantly higher production of IL-4 and significantly lower production of IFN-gamma were found in the group of patients compared with their healthy siblings. The increased level of IL-4 in patients was in good agreement with an increased level of IgM after stimulation of lymphocytes with *E. coli*. These results support Seymour's hypothesis according to which patients with progressive disease primarily activate Th2 lymphocytes while non-susceptible individuals activate Th1 lymphocytes.

Key words: Early onset periodontitis, Th1, Th2, Cytokine profile, Immunoglobulin, Peripheral blood lymphocytes, Familial study, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Escherichia coli*

Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings

Jiřina Bartov¹ CA, Zuzana Kratka Opatrn¹,
Jarmila Prochazkova¹, Otakar Krejsa¹,
Jana Duřkova¹, Lubor Mrklas¹, Helena Tlaskalova²
and Bozena Cukrowska²

¹Institute of Dental Research, Vinohradska 48, 12060 Praha 2, and ²Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vdenska 1083, 14000 Prague, Czech Republic

Corresponding Author:
Tel: +42 2 2456718
Fax: +42 2 24247084
E-mail: jirina.bartova@post.cz

Introduction

Early onset periodontitis (EOP) is a chronic inflammatory periodontal disease affecting individuals aged 17 to 25. Pathological changes of the periodontal tissue are characterised by a mild resorption of alveolar bone and the presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) in the gingival crevice area. Functional studies have demonstrated polymorphonuclear leukocytes (PMN) chemotactic defects in some 70% of subjects with EOP.

Periodontal disease is caused by bacteria in dental plaque, and evidence is accumulating that specific periodontal pathogens are associated with the progressive form of the disease.¹⁻³ However, some individuals harbour these specific bacteria but do not appear to show evidence of disease progression. Patient susceptibility is most likely genetically determined, although a number of local and environmental factors are thought to influence disease expression.⁴

Immunological mechanisms have been implicated in the pathogenesis of periodontal disease for over 50 years. In the 1970s, attention focused on the participation of peripheral blood T lymphocytes in response to the action of dental plaque bacteria and on their

role in the development of inflammation.⁵ Since then many papers have been published that concern the relationship between peripheral blood mononuclear cells (PBMC) blast transformation and periodontitis.⁶⁻⁷ The significance of the dental plaque bacteria on polyclonal B lymphocyte activation was really only studied later.⁸⁻⁹ Results showed that both specific and non-specific mechanisms of B lymphocyte activation can play a role in the pathogenesis of periodontal disease and that they can be highly influenced by the treatment.¹⁰⁻¹¹ At the same time, immunological studies clearly established the B cell/plasma cell dominance of the periodontitis lesion.¹²⁻¹⁴

Both specific and non-specific activation are regulated by T lymphocytes. Based on the concept of functional Th1/Th2 and Tc1/Tc2 subsets,¹⁵⁻¹⁷ a model for the pathogenesis of periodontal disease has been constructed.¹⁸⁻²¹ According to the hypothesis of Seymour *et al.*¹⁸ patients with progressive disease activate mainly Th2 lymphocytes in response to an antigenic stimulus whereas patients with the slow type of the disease activate Th1 lymphocytes. In the latter response it is proposed that a local expansion of the B cell population would result, on the one hand, in the production of IL-4 and hence subsequent

tissue destruction and, on the other hand, in the production of specific antibodies. It is further proposed that if protective antibody is produced it could result in the elimination of the organism and disease progression would cease. Production of antibody that is mainly protective would, however, result in continuous connective tissue breakdown.

Our present study concerns the effect of short term cultivation of peripheral blood lymphocytes with pokeweed mitogen (PWM), *A. a.* and *Escherichia coli* on the formation of IL-1 and IFN-gamma in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *A. a.* has been suggested to play a pathogenic role in the development of this disease.¹ In our previous studies we have shown that polyclonal activation of B cells with a suspension of *E. coli* leads to high production of immunoglobulins by PBMC of patients with periodontitis.¹⁷ The results should contribute to finding the origins of the susceptibility to early onset periodontitis.

Materials and methods

Two years before beginning this study the group of 17 patients with EOP was collected from a set of 9225 young (16-19 years) individuals at the Institute of Dental Research. These patients met the basic clinical diagnosis criterion of periodontitis: they had at least one periodontal pocket deeper than 5 mm, situated in the region of the molars or incisors, inflammation of gingiva and the presence of the suspect pathogen – the bacterium *A. a.* in the sulcular region. There were no individuals with systemic disease or pregnant women in the group of patients.

During the familial study¹⁸ we found that among the total of 17 patients and their 54 siblings only 6 patients had siblings with healthy periodontium and presence of *A. a.* in sulcular region. These families were included in this study.

In agreement with Helsinki conventions (1964) informed consent for blood collection for immunological examination was obtained from all persons examined.

Clinical examination

The examination of patients at the beginning of therapy included the determination of gingival inflammation using the gingival index (GI),¹⁹ ascertaining the depth of the pockets with the calibrated probe and X-ray. This was followed immediately by conservative treatment. The dental calculus was removed, unsatisfactory fillings or crowns were restored and correct tooth brushing technique was demonstrated. All patients were thoroughly instructed in oral hygiene including teeth cleaning and gingival massage. They were also warned that oral hygiene is the decisive factor in periodontitis therapy. The con-

servative part of the therapy lasted 4 weeks and was followed by a 10 day tetracycline treatment. Two weeks after the antibiotic therapy the patients were invited for a control clinical examination, with further check-ups at 3- and then 6-month intervals.

This study reports on the results of an immunological examination 2 years after the start of the therapy.

Bacterial suspension and mitogens

A. a. was isolated from a subgingival locality from the patients of the experimental group. Bacterial culture was incubated for 48 h in Brain Heart Infusion (Oxoid) medium and then inactivated for 20 min at 120 °C. The bacterial suspension was washed 4 times with physiological saline, centrifuged at 600 g and adjusted to the required concentration (10^7 cells/ml) with RPMI 1640 tissue culture medium.

The suspension of heat-killed bacteria of the *E. coli* 086 strain was obtained from the Department of Immunology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, and diluted to the experimentally optimal concentration (10^7 cells/ml) with RPMI medium.

PWM (*Phytolacca americana* mitogen, Sigma) and ConA (Concanavalin A, Sigma) were diluted to the experimentally optimal concentration (PWM 2 µg/ml, PWM 2 µg/ml + ConA 10 µg/ml) with RPMI 1640 tissue culture medium.

Stimulation of lymphocytes to cytokine and immunoglobulin production

Mononuclear cells isolated from the peripheral blood of the patients and their siblings with healthy periodontium were washed, diluted with a supplemented tissue culture medium RPMI 1640 to a concentration of 10^6 /ml and cultivated with mitogens and heat-killed bacteria (*A. a.* 10^7 /ml and *E. coli* 10^7 /ml) as described earlier.¹¹ Supernatants were taken after 24 h and after 7 days, which were then stored at -20 °C until further assay.

Assay of cytokines and immunoglobulins in culture media

Cytokine assay

Cytokines IL-1 and IFN-gamma were assayed in the tissue culture supernatants using commercial Immunotech France kits. The technique is based on the sandwich method in which monoclonal antibody is used as a binding antibody, and another biotinylated monoclonal antibody is used for detection. This second antibody reacts with the streptavidin-peroxidase conjugate. The binding enzymatic activity is determined by adding a chromogen (without TMB), and the colour intensity is measured on an SIT Spectra II microreader.

Enzyme linked immunosorbent assay of immunoglobulins ELISA assay of immunoglobulins

Polyclonal antibodies Q-SwaHu-IgM, Q-SwaHu-IgG or Q-SwaHu-IgA (Sevac, Prague) were used as the binding antibodies. After incubation and washings, control sera with defined immunoglobulin contents and the supernatants were applied. Following incubation and washing, peroxidase-labelled antibodies against human immunoglobulin (Q-SwaHu-IgM, Q-SwaHu-IgG or Q-SwaHu-IgA) were added. A 1-h incubation at room temperature was followed by washing the plates and the redox reaction with OPD in phosphate ELISA buffer (pH = 6.2) was developed using hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1M sulphuric acid and read on an SFL Spectra II ELISA reader. Individual samples were evaluated in ng/ml using the KIME E program.

Statistical evaluation

Student's pair *t*-test at a probability level of *P*=0.05 was used to evaluate the significance of differences between patients and their siblings. The results are presented as mean ± SE.

Results

Cytokine production by PBMC after a 24-h stimulation by mitogen and bacteria suspensions is shown in Table 1. The IFN-gamma formation was found to be significantly higher in healthy siblings than in the patients after stimulation by *A. a.* and *E. coli*. On the other hand, a significantly higher formation of IL-4 was detected in patients after stimulation by *A. a.* and *E. coli* as compared with their healthy siblings.

The release of immunoglobulins after a 7-day stimulation of PBMC by mitogen and bacteria suspensions is shown in Table 2. Compared to their siblings patients exhibited a significantly higher IgM level after polyclonal stimulation with *E. coli*. The formation of IgA was significantly higher in the patients than in their siblings in cultures stimulated by both PWM and ConA. No significant differences were found after

stimulation of PBMC by other mitogens and in unstimulated cultures. No significant differences were found in the level of IgG.

Discussion

Evidence based on microbiological, immunological and animal studies has shown that some forms of periodontal disease in adults can remain stable over many years and not endanger the life of the dentition, whereas other forms, despite extensive treatment, continue to break down, leading ultimately to tooth loss.²²

The regulatory activity of T lymphocytes and the identification of which cytokines are present have been studied intensively in order to shed some light on the pathogenesis of periodontal disease. It has been shown that individuals susceptible to periodontal disease predominantly activate Th2 lymphocytes, while non-susceptible individuals activate Th1 lymphocytes.²³

The verification of this hypothesis required a correct selection of patients. Patients with early onset periodontitis (susceptible individuals) and their siblings with healthy periodontium (non-susceptible individuals), both exhibiting presence of *T. a.* seem to be ideal for the study of the role of Th1 and Th2 lymphocytes in the pathogenesis of the disease. Despite the similar genetic backgrounds, similar age and similar hygiene habits in families, we found different production of cytokines after *in vitro* stimulation.

The majority of immune responses occur locally rather than systemically within a small area of tissue; therefore most authors have concentrated on the T cells isolated from inflamed tissues of patients.^{19,21,24} This tissue can be obtained during surgical treatment of seriously affected patients. Lymphocytes isolated from peripheral blood of patients are rarely used.^{2,25,26} The use of PBMC is favourable for analysing the transformation of the immune response during the disease's remission, when it is not possible to use cells from the tissue.

PBMC were capable of expressing mRNA for IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and IFN-gamma.

Table 1. Release of IFN-gamma and IL-4 after the stimulation (24 h) of PBMC by mitogens and antigens^a

Mitogens and activators	IFN-gamma (U/ml × 1000)			IL-4 (ng/ml)		
	Patients	Siblings	Significance	Patients	Siblings	Significance
PWM	30 ± 12	29 ± 12		92 ± 40	136 ± 65	
PWM+ConA	34 ± 11	861 ± 824		175 ± 62	104 ± 45	
<i>A. a.</i>	6 ± 2	178 ± 14	<i>P</i> <0.05	394 ± 216	55 ± 22	<i>P</i> <0.05
<i>E. coli</i>	4 ± 1	125 ± 10	<i>P</i> <0.05	149 ± 51	35 ± 19	<i>P</i> <0.05
Unstimulated	140 ± 734	54 ± 4		50 ± 25	52 ± 22	

^a Student's pair *t*-test at a probability level of *P*=0.05 was used to evaluate the significance of differences between patients and their siblings. The results are presented as mean ± SE.

Table 2 Release of immunoglobulins after the stimulation of PBMC by mitogens and antigens (results in ng/ml)

Mitogens and activators	IgM			IgA			IgG		
	Patients	Subjects	Significance	Patients	Subjects	Significance	Patients	Subjects	Significance
PWM	129 ± 85	32 ± 17		4626 ± 2195	5520 ± 1992		3510 ± 1307	4567 ± 319	
PWM+ConA	13 ± 5	6 ± 3		1169 ± 367	378 ± 203	P=0.05	1320 ± 445	2372 ± 1259	
A. n.	4 ± 2	3 ± 3		2928 ± 2874	298 ± 256		1367 ± 1285	2220 ± 1505	
E. coli	7 ± 2	2 ± 1	P=0.05	1492 ± 1040	1884 ± 1627		1490 ± 603	2325 ± 1320	
Unstimulated	4 ± 1	4 ± 3		1194 ± 1039	971 ± 723		4576 ± 1434	3106 ± 1379	

Student's *t*-test at a probability level of 0.05 was used to evaluate the significance of differences between patients and their subjects. The results are presented as mean ± SD.

following stimulation by ConA for 2 h.²⁷ Cells isolated from affected tissue only expressed IL-10, IL-6, IL-13 and IFN-gamma. It seems that PBMC were capable of producing a whole spectrum of cytokines, but after homing of T cells into inflamed tissue, they were only capable of expressing either Th1 or Th2 cytokines.

By immunohistochemical analysis a higher percentage of IL-4 and IL-6 producing cells was found in the tissues affected by inflammation.²⁵ Following *in vitro* stimulation by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*, most lymphocytes obtained from biopsies of periodontitis affected tissues were of the Th2 phenotype, i.e. they formed high amounts of IL-4 and only small amounts of IL-2 and IFN-gamma.²⁸ Manhart *et al.*²⁹ proved that altered IL-2/IL-4 activities were founded in lesion of patients with early onset periodontitis.

After activation by PHA, CD8+CD28+ cells isolated from inflamed lesions of patients with adult periodontitis^{25,26} produced high amounts of IFN-gamma and were shown to have cytotoxic activity, whereas CD8+CD28- cells produced predominantly IL-4 and IL-5 and they showed a suppressive effect.

We found a significantly higher formation of IL-4 and significantly lower formation of IFN-gamma after *E. coli* stimulation in patients with EOP as compared with their siblings. These results corroborate the finding of a significantly higher count of PBMC that produce IL-4 after *P. gingivalis* and lipopolysaccharide (LPS) stimulation, which was detected by Aoyagi *et al.*³⁰ in patients with adult periodontitis.

As a B cell growth factor, IL-4 stimulates the proliferation and differentiation of B lymphocytes and induces the expression of MHCII class II antigens on B lymphocytes. It also stimulates the antigen-specific antibody response, which has a protective character and will probably be activated in patients in the resting stage.^{31,32} On the other hand, polyclonal activation probably leads to the progression of the disease.

A higher production of immunoglobulins after the polyclonal stimulation of B lymphocytes was found in patients compared with their siblings. Compared to their siblings, patients exhibited a significantly higher IgM level after polyclonal stimulation with *F. coli*. The formation of IgA was significantly higher in the patients than in their siblings in cultures co-stimulated by PWM and ConA.

Prediction of clinical disease activity in patients is not yet possible, and only the measurement of past activity is currently available. The establishment of a means for classifying patients as susceptible or non-susceptible is therefore necessary to define patient selection more precisely.³³ The pathogenic mechanisms involved in the development of EOP have yet to be elucidated, but the prevalent production of IL-4 by the patients' peripheral blood lymphocytes suggests that Th2 cells, and probably B cells, and their

products may play an important role in the pathogenesis of this disease.

ACKNOWLEDGMENTS: This study was supported by the Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

References

1. Jancoskius KJ, Baccarini M, West JB, Hess LM. *Periodontitis*. *Semin Oncol* 1998; 25:108-18.
2. Kotani H, Keys PH. Acrylic agglutination. The main factor as etiological agent of experimental disease in ferrets. *J Clin Invest* 1961; 40:100-14.
3. Schmidt H. Importance of the host response in the development of chronic disease. *Immunol* 1997; 148:17-27.
4. Brady RO. The role of stimulation of lymphocytes by antigens in patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1974; 53:1089-93.
5. Paronik J, Kral J, Kralova K. Stimulation by products of oral pathogens in the periodontal disease. *J Clin Invest* 1974; 53:1111-17.
6. Mackay JL, Vignani R. Susceptibility to periodontitis: role of lymphocyte activation and control of cytokine production by T4 and Th17 cells in the regulation of macrophage production by T4 and Th17 cells. *Immunol* 1997; 149:15-24.
7. Mackay JL, Vignani R, Welford SM. Host genetic susceptibility to periodontitis: host genetics and the production of cytokines by oral lymphocytes from patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1443-53.
8. Hoshikawa T, Hoshino H, Hoshino H. Genetic responses by lymphocytes from patients with early onset periodontitis to periodontitis-associated bacteria. *J Periodontol* 1987; 58:705-11.
9. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A review of recent works. *J Periodontol* 1976; 54:248-60.
10. Mackay JL, Hoshino H, Roberts G, et al. B cell-derived interleukin-6 is a major cytokine in periodontitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1454-63.
11. Schmidt H. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontitis. *J Periodontol* 1997; 68:77-83.
12. Okada H, Kato T, Yamaguchi T, et al. Interleukin-6 and interleukin-8 expression in periodontal tissues in patients with gingivitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1464-71.
13. Kawanishi T. The role of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1472-80.
14. Moller H, Thomsen M, et al. Th2 cells attract patients to lymphocytes with high and low mitogenic properties. *Immunol* 1997; 141:71-77.
15. Okada H, Kato T, Yamaguchi T, et al. Interleukin-6 induces periodontitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1481-90.
16. Schmidt H, Berglund E, Scharf R, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in gingival tissue of patients with periodontal and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1993; 20:175-81.
17. Schmidt H, Berglund E, Westberg K, et al. M. Parodontitis is a T-helper cell disease. *Exp Clin Immunol* 1994; 109:301-5.
18. Hoshikawa T, Hoshino H, Hoshino H. Interleukin-6 and interleukin-8 are major cytokines secreted by specifically stimulated B lymphocytes from healthy donors and patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.
19. Pradolinski J, Hoshino H, Kawanishi T, Hoshino H, Hoshino H. Interleukin-6 and interleukin-8 are major cytokines secreted by specifically stimulated B lymphocytes from healthy donors and patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.
20. Lee H, Tachibana T, Hansen JB. Experimental gingivitis in ferrets. *Periodontol* 1985; 40:17-28.
21. Hoshikawa T, Hoshino H, Hoshino H. Interleukin-6 and interleukin-8 are major cytokines secreted by specifically stimulated B lymphocytes from healthy donors and patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.
22. Schmidt H. Possible mechanisms for the initiation and maintenance of chronic inflammation in periodontal disease. *J Periodontol* 1987; 58:705-11.
23. Yamazaki K, Nakajima T, et al. Immunohistochemical analysis of interleukin-6 and interleukin-8 in the gingival connective tissue of patients with periodontitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.
24. Mackay JL, Schroeder HE, Brady RO, et al. Interleukin-6 and interleukin-8 are major cytokines secreted by specifically stimulated B lymphocytes from healthy donors and patients with periodontal disease. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.
25. Watanabe Y, Burtchard H, et al. Interleukin-4 and interleukin-6 are secreted from stimulated peripheral blood mononuclear cells in patients with periodontitis. *J Clin Invest* 1997; 100:1490-8.

- Watanabe A, Kawanishi S, Ueda H, et al. (1997) Molecular expression of interleukin-1 α and interleukin-1 β in human gingival tissues in response to plaque-induced inflammation. *J Dent Res* **76**: 1142-1148.
24. Ueda H, Watanabe S, Rattanaporn P, Ueda H, et al. (1998) Molecular and histologic parameters responsible for plaque-induced inflammation of gingiva in response to plaque-induced inflammation. *J Dent Res* **77**: 1841-1848.
25. Kato Y, Inoue K, Watanabe K, et al. (1998) Regulation of interleukin-1 α and interleukin-1 β in gingival tissues and its relationship to plaque-induced inflammation. *J Dent Res* **77**: 1849-1854.
26. Ueda H, Kawanishi S, Ueda H, et al. (1998) Molecular expression of interleukin-1 α and interleukin-1 β in response to plaque-induced inflammation of human gingival tissues. *Exp Dent* **1996**: 105-112.
27. Kawaji T, Sugawara Y, Ueda M, Yamazaki K, Hara K, et al. (1998) Interleukin-1 α and interleukin-1 β mRNA levels in peripheral blood and gingival tissues in periodontitis patients with high serum antibody titer to *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **1995**: 103-109.
28. Ogumura T, Marshall RJ, Spector AA. (1997) Cytokines and prostaglandins in chronic, nonerosive and tissue destruction in periodontal disease. *Oral Surg* **1997**: 14-112-115.

Received 27 March 2000;
accepted 31 March 2000

7.4. Experimentální část č. 4

7.4.1. *Využití metody ELISPOT k detekci buněk produkujících cytokiny po stimulaci bakteriemi*

V letech 2001 – 2003 byla sledována produkce cytokinů na buněčné úrovni pomocí metody ELISPOT (Enzyme Linked Immunosorbent Spot), která umožňuje stanovit počet buněk produkujících daný cytokin. V době, kdy probíhal tento experiment, nebyl k dispozici cenově dostupný počítačový program umožňující automaticky zhodnotit počet spotů v jamkách desek. Potřebné makro bylo vytvořeno v rámci této studie pomocí systému obrazové analýzy LUCIA G.

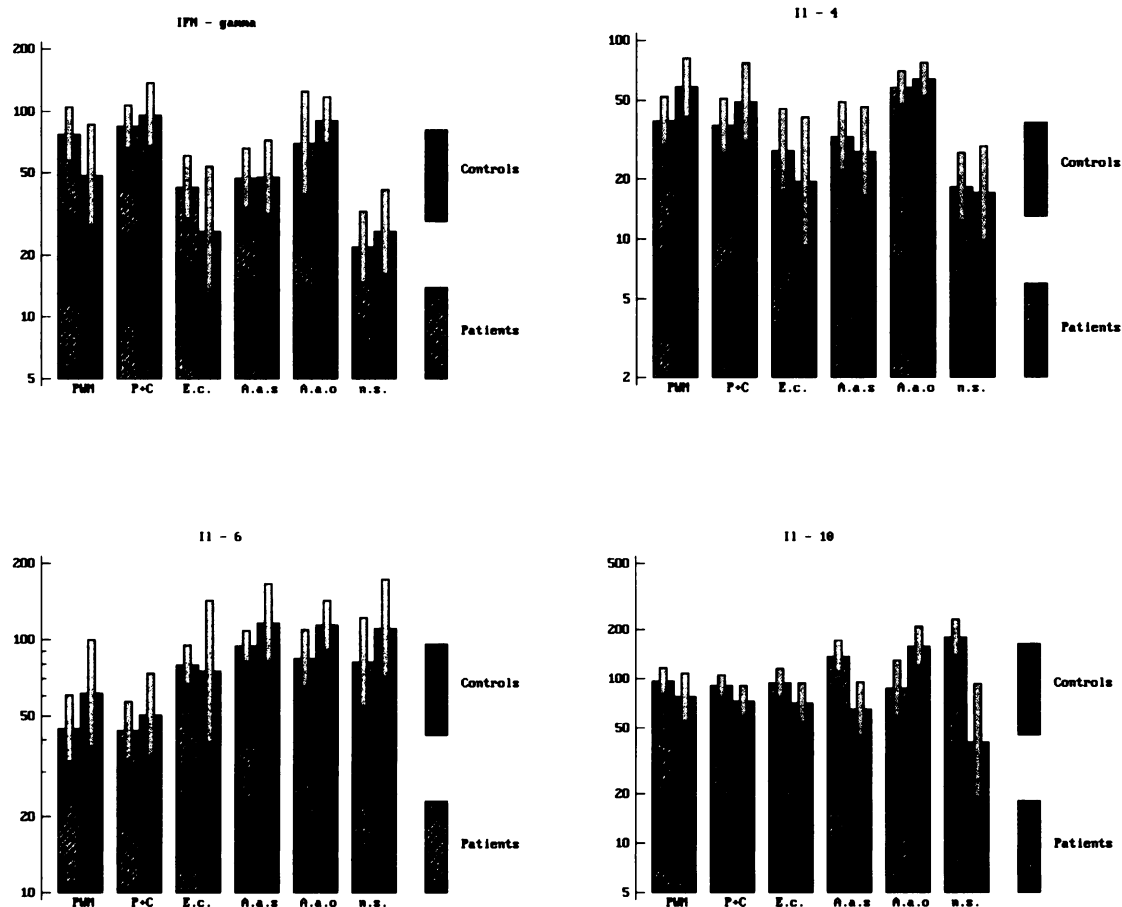
Mononukleární buňky byly izolované z periferní krve pacientů (21 osob) a zdravých kontrolních osob (14 osob). Poté byly buňky stimulovány 3, 5 a 7 dní s PWM, standardním kmenem *E. coli*, standardním kmenem *A. a.*, kmeny *A. a.* izolovanými ze sulku resp. parodontálního chobotu daného pacienta či kontrolní osoby (tzv. vlastní kmen *A. a.*). Buňky byly poté přeneseny na speciální desky a pomocí souprav Biosource nebo Diaclone byla provedena metoda ELISPOT. Byl zjišťován počet buněk produkujících IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ .

Desky byly nasnímány digitální kamerou a snímky byly převedeny do počítačového programu LUCIA. Jelikož jednotlivé spoty se značně lišily svojí velikostí, byl v průběhu měření zjišťován počet malých, středně velkých a velkých spotů. Statistická analýza byla provedena z logaritmičsky transformovaných dat pomocí Studentova t-testu.

7.4.1.1. Charakteristika spotů

Průměrný počet spotů se pohyboval od 20 do 300 buněk z 10^6 kultivovaných mononukleárních buněk v závislosti na typu použité stimulace (Graf č. 1). Nejvíce buněk produkovalo IL-10 a IL-6, naopak nejméně buněk tvořilo IL-4. V nestimulovaných kulturách u obou sledovaných skupin se vyskytoval velký počet buněk, které spontánně produkovaly cytokiny IL-6 a IL-10.

Graf č. 1 - Průměrný počet spotů po mitogenní a bakteriální stimulaci



Geometrický průměr počtu spotů / 10⁶ mononukleárních buněk, včetně SD

Jednotlivé spoty se výrazně lišily svojí velikostí. Z analýzy velikosti spotů vyplynulo, že 85 – 95 % spotů patřilo mezi spoty malé, 5 – 12 % spotů patřilo mezi střední a pouze 1 – 3 % spotů byly spoty velké. Střední spoty byly nalezeny ve větším počtu u pacientů a tyto buňky produkovaly zejména IFN- γ a IL-6.

7.4.1.2. Tvorba spotů po bakteriální stimulaci

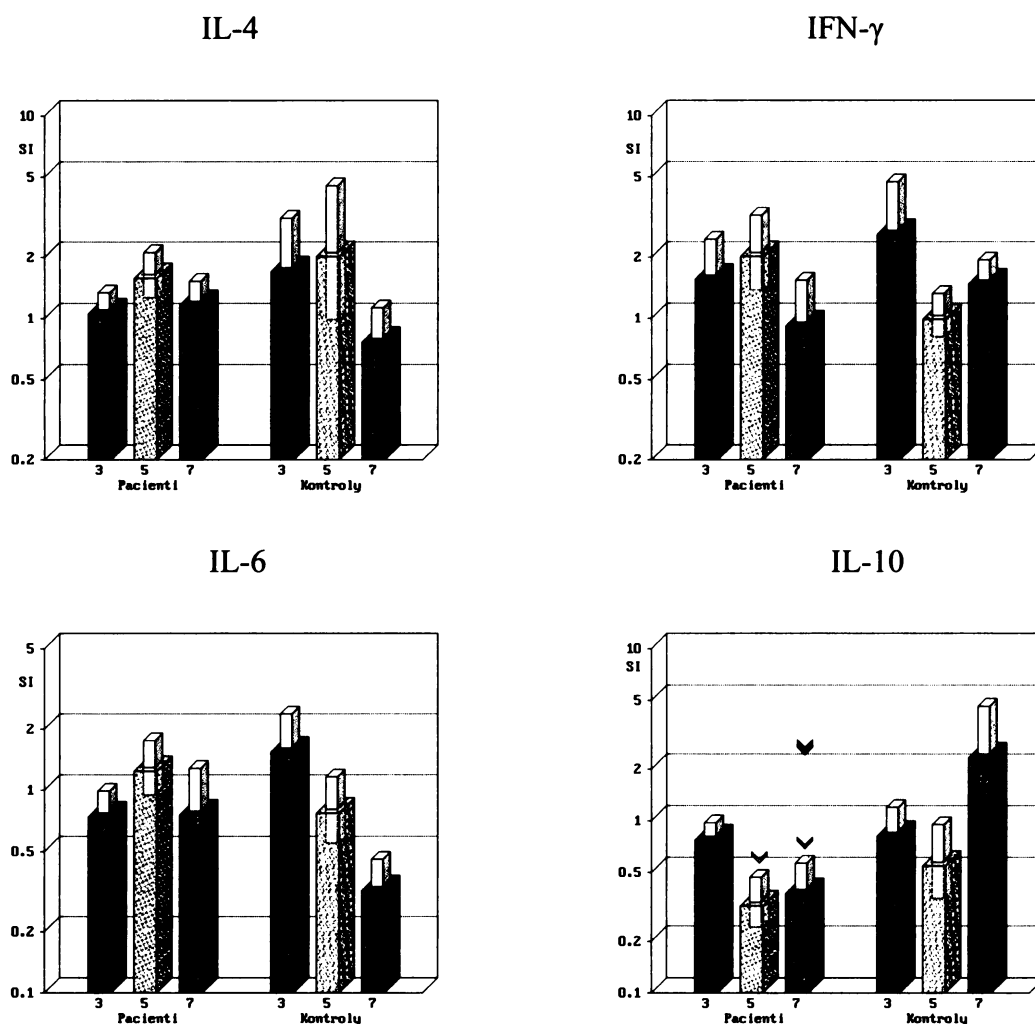
Po stimulaci buněk *E. coli*, vlastním a standardním kmenem *A. a.* byly zjištěny výrazné rozdíly v imunitní odpovědi mezi pacienty a kontrolními osobami. Zatímco imunitní reakce zdravých osob měla podobný průběh nezávisle na použité bakterii, imunitní reakce pacientů se lišila podle použité bakteriální stimulace.

Efekt stimulace *E. coli*

Působením *E. coli* došlo jak ke stimulaci, tak k poklesu počtu spotů (tj. buněk tvořících cytokiny) vzhledem k počtu spotů v nestimulovaných kulturách. K signifikantnímu snížení počtu IL-10+ spotů došlo u pacientů pátý a sedmý den kultivace (Graf č. 2).

Maximální počet IL-4+ spotů byl jak u pacientů, tak u zdravých osob zjištěn pátý den stimulace. Maximální počet IFN- γ + spotů byl detekován pátý den u pacientů, ale třetí den u zdravých osob. Maximální počet IL-6+ spotů byl detekován u pacientů pátý den, kdežto již třetí den stimulace u zdravých osob. Maximální počet IL-10+ spotů byl zjištěn třetí den u pacientů, ale až sedmý den u zdravých osob, proto byla sedmý den stimulace zjištěna signifikantně vyšší tvorba IL-10+ spotů u zdravých osob než u pacientů.

Graf č. 2 - Počet IL-4+, IFN- γ +, IL-6+ a IL-10+ spotů po stimulaci *E. coli*.



Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

SI = Počet spotů po stimulaci / Počet spotů v nestim. kultuře

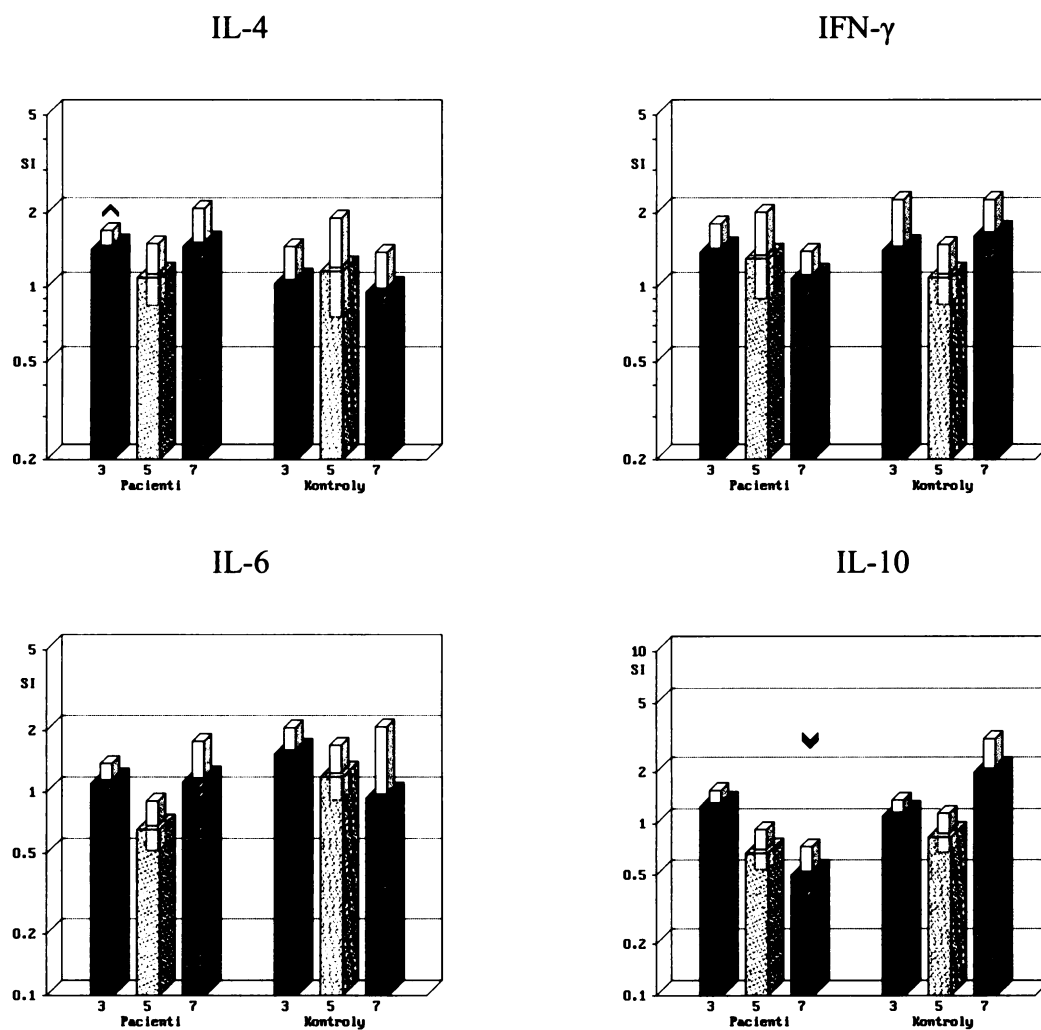
Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (velká šipka)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní inhibice (malá šipka)

Efekt stimulace vlastním a standardním kmenem *A. a.*

Po stimulaci *A. a.* docházelo jak ke zvyšování, tak k poklesu počtu spotů vzhledem k počtu spotů v nestimulované kultuře. K signifikantnímu zvýšení počtu IL-4+ spotů po stimulaci standardním kmenem *A. a.* došlo třetí den u pacientů (Graf č. 3). K signifikantnímu zvýšení počtu IFN- γ + spotů po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* došlo třetí den také u pacientů (Graf č. 4).

Graf č. 3 - Počet IL-4+, IFN- γ +, IL-6+ a IL-10+ spotů po stimulaci standardním kmenem *A. a.*



Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (velká šipka)

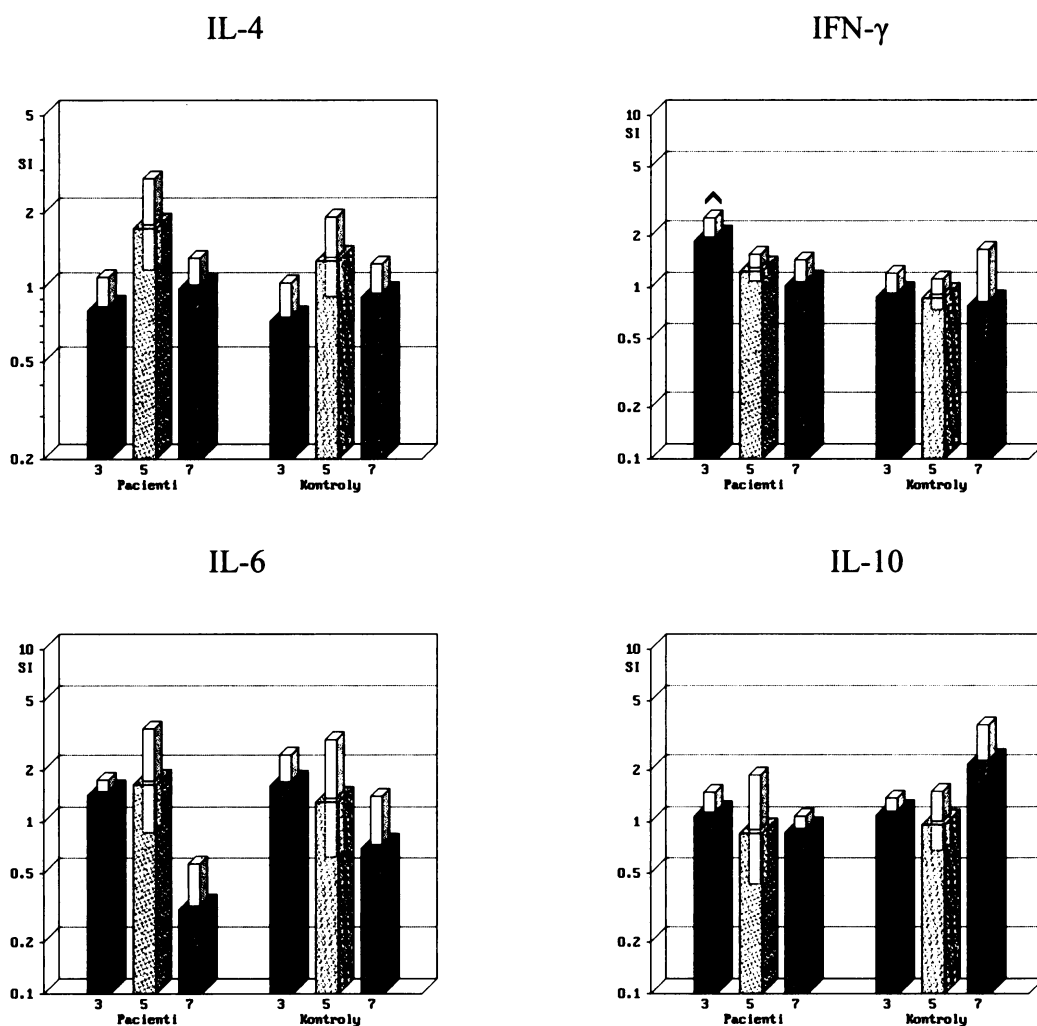
Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní stimulace (malá šipka)

Průběh produkce cytokinů u zdravých osob byl po stimulaci vlastním nebo standardním kmenem *A. a.* takřka totožný. U zdravých osob byl maximální počet IL-6+ buněk byl detekován třetí den, maximální počet IL-4+ buněk byl zjištěn pátý den a maximální počet IL-

10+ buněk byl detekován sedmý den. Maximální počet IFN- γ + buněk byl zjištěn třetí den po stimulaci vlastním kmenem *A. a.*, ale sedmý den po stimulaci standardním kmenem *A. a.*

Stimulace vlastním a standardním kmenem *A. a.* ovlivňovala u pacientů nejvíce kinetiku IL-4 a IL-6. Maximální počet IL-4+ buněk byl zjištěn u pacientů sedmý den po stimulaci standardním kmenem *A. a.* (Graf č. 3), ale již pátý den po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* (Graf č. 4). Maximální počet IL-6+ spotů byl u pacientů zjištěn sedmý den po stimulaci standardním kmenem *A. a.*, ale již pátý den po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* Maximální počet IL-10+ a IFN- γ + spotů byl zjištěn u pacientů třetí den po stimulaci oběma kmeny *A. a.*

Graf č. 4 - Počet IL-4+, IFN- γ +, IL-6+ a IL-10+ spotů po stimulaci vlastním kmenem *A. a.*

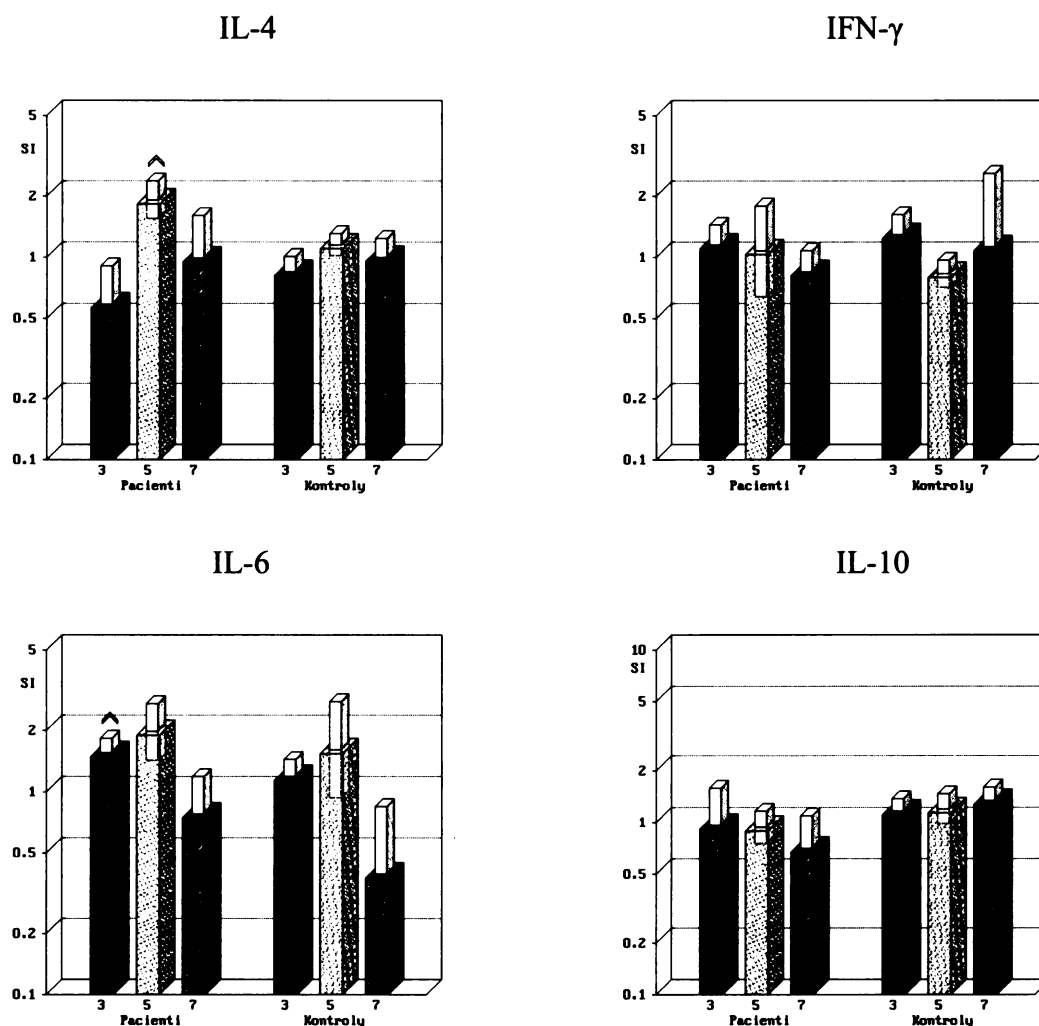


Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní stimulace (malá šipka)

Poměr mezi počtem spotů po stimulaci vlastním a standardním kmenem *A. a.* je vyjádřen v Grafu č. 5. Signifikantně vyšší počet IL-4+ i IL-6+ spotů po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* než po stimulaci standardním kmenem *A. a.* byl zjištěn u pacientů třetí den resp. pátý den stimulace.

Graf č. 5 – Poměr počtu IL-4+, IFN- γ +, IL-6+ a IL-10+ spotů po stimulaci vlastním *A. a.* a počtu spotů po stimulaci standardním *A. a.*



Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní stimulace (šipka)

Závěry: Metodou ELISPOT byl sledován počet buněk produkujících cytokiny v průběhu jejich 7denní kultivace s bakteriemi u pacientů (léčených již deset let) a zdravých osob. Průběh reakce byl u zdravých osob takřka nezávislý na použité bakteriální stimulaci. Naopak u pacientů s časnou parodontitidou byla detekována rozdílná reakce na stimulaci vlastním nebo cizím kmenem *A. a.*. Na přítomnost vlastního kmenu *A. a.* a nepatogenního kmenu *E. coli* reagovaly buňky pacientů podobnou imunitní reakcí, která měla podobný průběh jako u

zdravých osob. Naopak po stimulaci standardním kmenem *A. a.* došlo u pacientů k útlumu imunitní reakce na rozdíl od stimulace vlastním kmenem *A. a.* U pacientů byl zjištěn třetí den stimulace signifikantně nižší počet buněk produkující IL-6 po stimulaci standardním kmenem *A. a.* než vlastním kmenem *A. a.* a zároveň pátý den stimulace byl detekován signifikantně nižší počet buněk produkujících IL-4.

7.4.2. *Produkce cytokinů po bakteriální stimulaci*

V supernatantech, které byly odebrané po kultivaci mononukleárních buněk s bakteriemi těsně před použitím buněk k metodě ELISPOT, byla metodou ELISA zjišťována koncentrace cytokinů IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ .

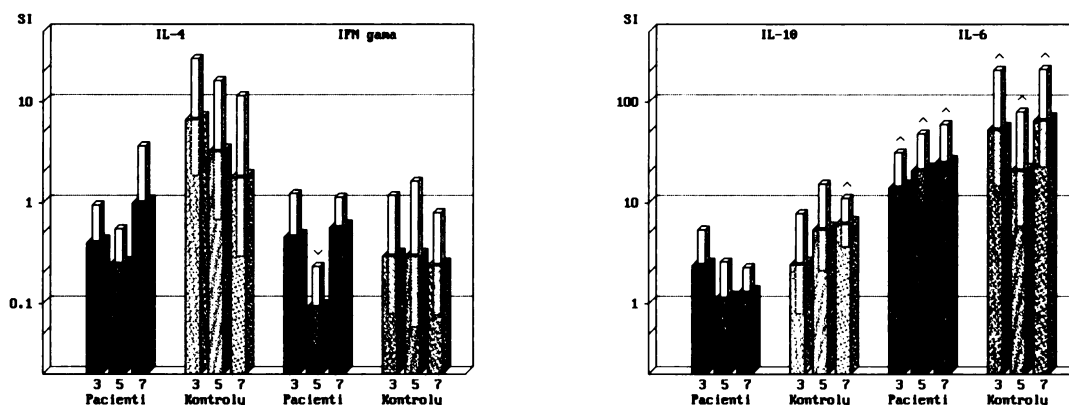
Naměřená data byla logaritmicky transformována, a poté byla zhodnocena nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $p=0,05$.

Efekt stimulace *E. coli*

Signifikantně nižší koncentrace IFN- γ , ale signifikantně vyšší tvorba IL-6 byla zjištěna po stimulaci *E. coli* než v nestimulované kultuře u pacientů a u zdravých osob.

U zdravých osob byla po stimulaci *E. coli* detekována maximální produkce IL-4 třetí den, IFN- γ pátý den, IL-6 a IL-10 sedmý den (Graf č. 6). U pacientů byla po stimulaci *E. coli* zjištěna maximální koncentrace IL-10 třetí den, ale maximální koncentrace IL-4, IL-6 a IFN- γ sedmý den. Mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v produkci cytokinů.

Graf č. 6 - Koncentrace cytokinů IL-4, IFN- γ , IL-10 a IL-6 po stimulaci *E. coli*



Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

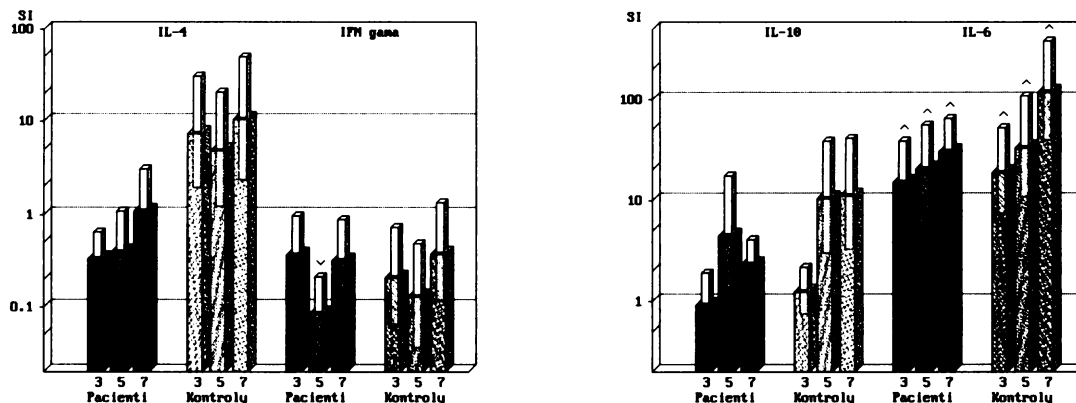
Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní inhibice (šipka dolů) nebo stimulace (šipka nahoru)

Efekt stimulace standardním a vlastním kmenem *A. a.*

Signifikantně nižší hladiny IFN- γ než v nestimulované kultuře byly detekovány u pacientů po stimulaci oběma kmeny *A. a.*, u zdravých osob po stimulaci standardním kmenem *A. a.* Signifikantně vyšší hladiny IL-6 byly detekovány po stimulaci oběma kmeny *A. a.* než v nestimulované kultuře u pacientů i u zdravých osob.

Po stimulaci standardním kmenem *A. a.* byla u zdravých osob naměřena maximální koncentrace všech cytokinů až sedmý den (Graf č. 7). Po stimulaci standardním kmenem *A. a.* byla u pacientů maximální koncentrace IFN- γ detekována třetí den, IL-10 pátý den a IL-4 a IL-6 sedmý den. Mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v produkci cytokinů.

Graf č. 7 - Koncentrace cytokinů IL-4, IFN- γ , IL-10 a IL-6 po stimulaci standardním kmenem *A. a.*



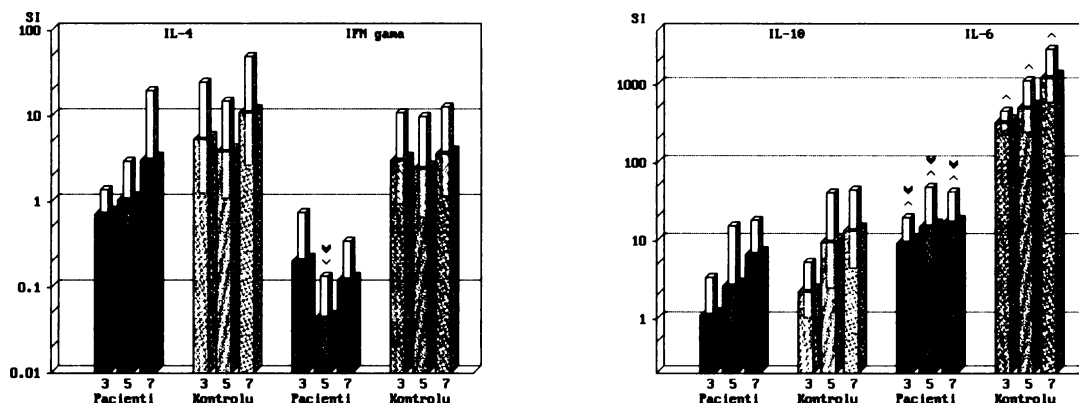
Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní inhibice (šipka dolů) nebo stimulace (šipka nahoru)

Po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* byla u zdravých osob i pacientů zjištěna maximální koncentrace všech cytokinů až sedmý den, s výjimkou maximální produkce IFN- γ třetí den u pacientů (Graf č. 8). Signifikantně vyšší hladiny IL-6 byly zjištěny u zdravých osob než u pacientů ve všech třech dnech. Signifikantně vyšší koncentrace IFN- γ byla zjištěna u zdravých osob než u pacientů pátý den stimulace.

Graf č. 8 - Koncentrace cytokinů IL-4, IFN- γ , IL-10 a IL-6 po stimulaci vlastním kmenem

A. a.



Uvedeny jsou geometrické průměry stimulačních indexů (SI) včetně SD

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní inhibice (malá šipka dolů) nebo stimulace (malá šipka nahoru)

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (velká šipka)

Závěry:

Vyšší koncentrace cytokinů po bakteriální stimulaci byly detekovány u zdravých osob než u pacientů. Signifikantně vyšší hladiny IL-6 byly po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* zjištěny u zdravých osob než u pacientů ve všech třech dnech. Signifikantně vyšší koncentrace IFN- γ byla zjištěna u zdravých osob než u pacientů pátý den stimulace.

Závěry : porovnání výsledků metody ELISA a ELISPOT

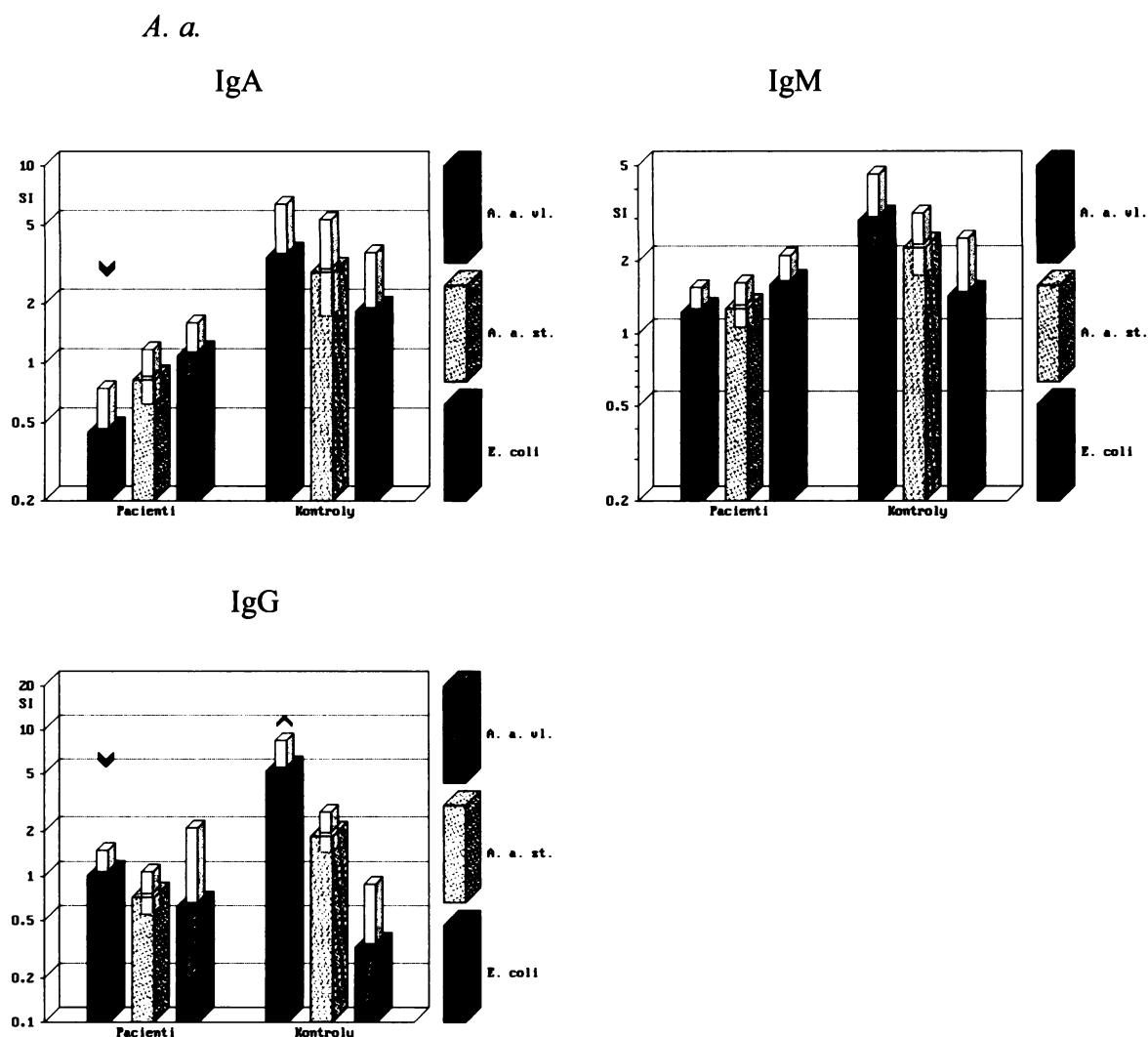
Porovnáním počtu buněk produkujících daný cytokin a koncentrace cytokinu v médiu jsme zjistili, že maximální koncentrace cytokinů se vyskytovala ve dnech s maximálním počtem spotů nebo v následujícím dni.

Výjimkou byla tvorba IL-6 u zdravých osob ve všech bakteriálních stimulacích. Nejvyšší koncentrace IL-6 byla zjištěna sedmý den, avšak maximální počet IL-6+ spotů byl detekován již třetí den a poté výrazně klesal. Tento jev vysvětluje přítomnost velkých spotů, představujících buňky, které produkují velké množství cytokinů. Malý počet těchto buněk vytvořilo velké množství cytokinů. Podobný výrazný efekt velkých IL-10+ spotů se uplatnil také u pacientů po stimulaci vlastním kmenem *A. a.*

7.4.3. Produkce imunoglobulinů po bakteriální stimulaci

Koncentrace imunoglobulinů IgA, IgM a IgG byla detekována v supernatantech získaných sedmý den stimulace. Po stimulaci *E. coli* byla u zdravých osob detekována signifikantně vyšší hladina IgG než v nestimulované kultuře. Po stimulaci *E. coli* byla zjištěna signifikantně vyšší tvorba IgG a IgA u zdravých kontrol než u pacientů (Graf č. 9). Po stimulaci standardním kmenem *A. a.* byla zjištěna vyšší tvorba IgM a IgG u zdravých osob než u pacientů. Po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* byla u zdravých osob zjištěna vyšší tvorba IgA, ale nižší tvorba IgM a IgG než u pacientů.

Graf č. 9 - Produkce imunoglobulinů po stimulaci *E. coli*, standardním a vlastním kmenem



Geometrický průměr stimulačních indexů včetně SD

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (velká šipka)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní stimulace (malá šipka nahoru)

Závěry: Vyšší produkce cytokinů vedla k signifikantně vyšší produkci imunoglobulinů po bakteriální stimulaci u zdravých osob než u pacientů. Signifikantně vyšší produkce IgA a IgG byla zjištěna po stimulaci *E. coli* u zdravých osob než u pacientů.

7.4.3.1. Výsledky dlouhodobé studie

Produkce imunoglobulinů po stimulaci standardními kmeny *A. a.* a *E. coli* byla pravidelně sledována i při pravidelném imunologickém vyšetření pacientů. Data byla logaritmicky transformována a geometrické průměry byly použity ke statistickým analýzám. Pomocí párového Studentova t-testu byl zjišťován signifikantní vzestup nebo pokles produkce imunoglobulinů po bakteriální stimulaci než v nestimulované kultuře. Pomocí párového Studentova t-testu byly zjišťovány signifikantní rozdíly v tvorbě imunoglobulinů mezi pacienty a jejich sourozenci, naopak pomocí nepárového Studentova t-testu byly zjišťovány signifikantní rozdíly mezi pacienty a zdravými osobami.

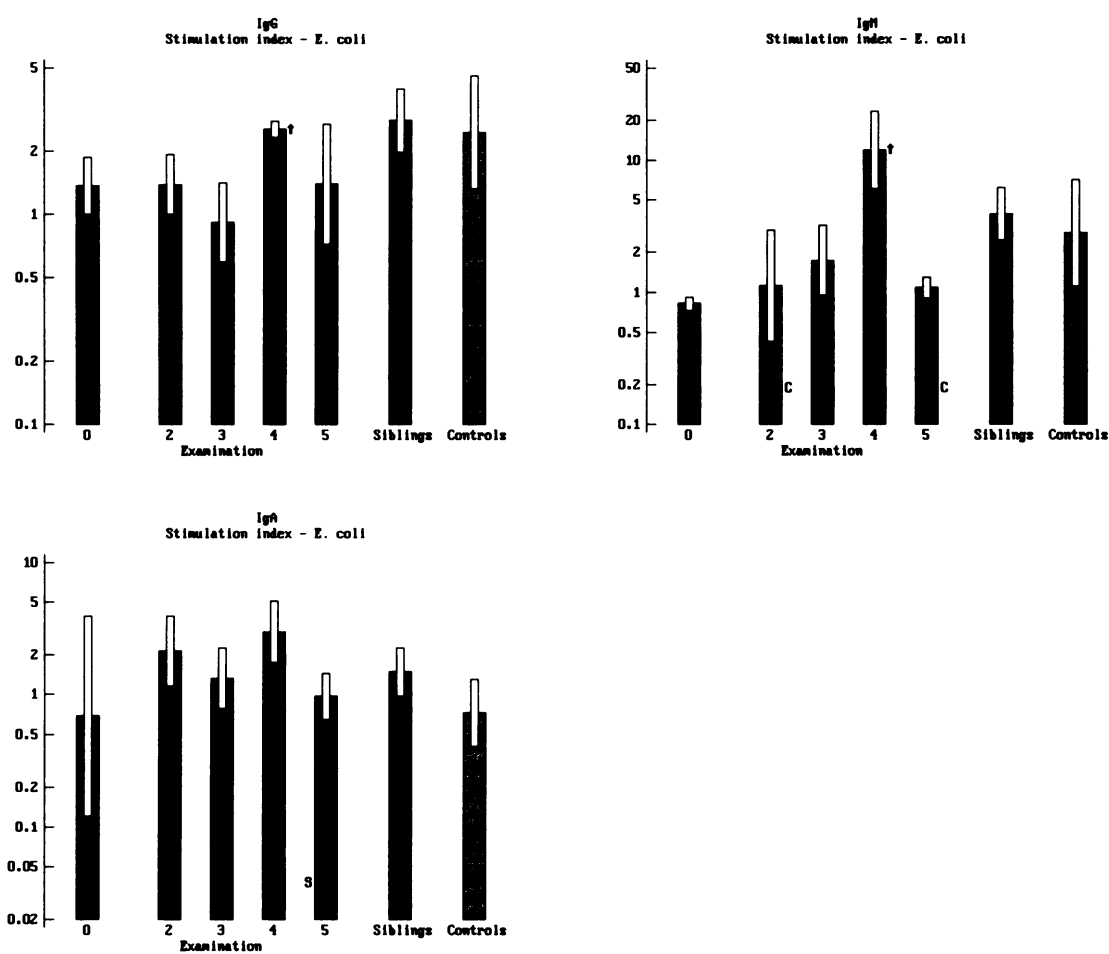
Stimulace *E. coli*

Mononukleární buňky stimulované *E. coli* produkovaly vyšší hladiny imunoglobulinů než buňky v nestimulované kultuře. K signifikantní stimulaci tvorby IgM a IgG po stimulaci *E. coli* došlo u pacientů v osmém roce studie (Graf č. 10).

Signifikantní rozdíly po stimulaci *E. coli* mezi zdravými osobami a pacienty byly detekovány ve čtvrtém a desátém roce studie, kdy byla zjištěna signifikantně nižší produkce IgM u pacientů než u zdravých osob a signifikantně nižší produkce IgA u pacientů než u jejich zdravých sourozenců.

Stimulace *A. a.*

Po stimulaci *A. a.* došlo u zdravých osob a zdravých sourozenců ke stimulaci tvorby imunoglobulinů. (Graf č. 11). Signifikantně nižší produkce IgM po stimulaci *A. a.* byla na začátku a v prvním roce studie zjištěna u pacientů než u jejich zdravých sourozenců. Signifikantně nižší produkce IgM po stimulaci *A. a.* byla ve čtvrtém roce studie zjištěna u pacientů než u zdravých kontrolních osob. V produkci IgG a IgA nebyly po stimulaci *A. a.* zjištěny žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami.

Graf č. 10 - Produkce imunoglobulinů po stimulaci *E. coli*

Geometrický průměr stimulačních indexů včetně SD.

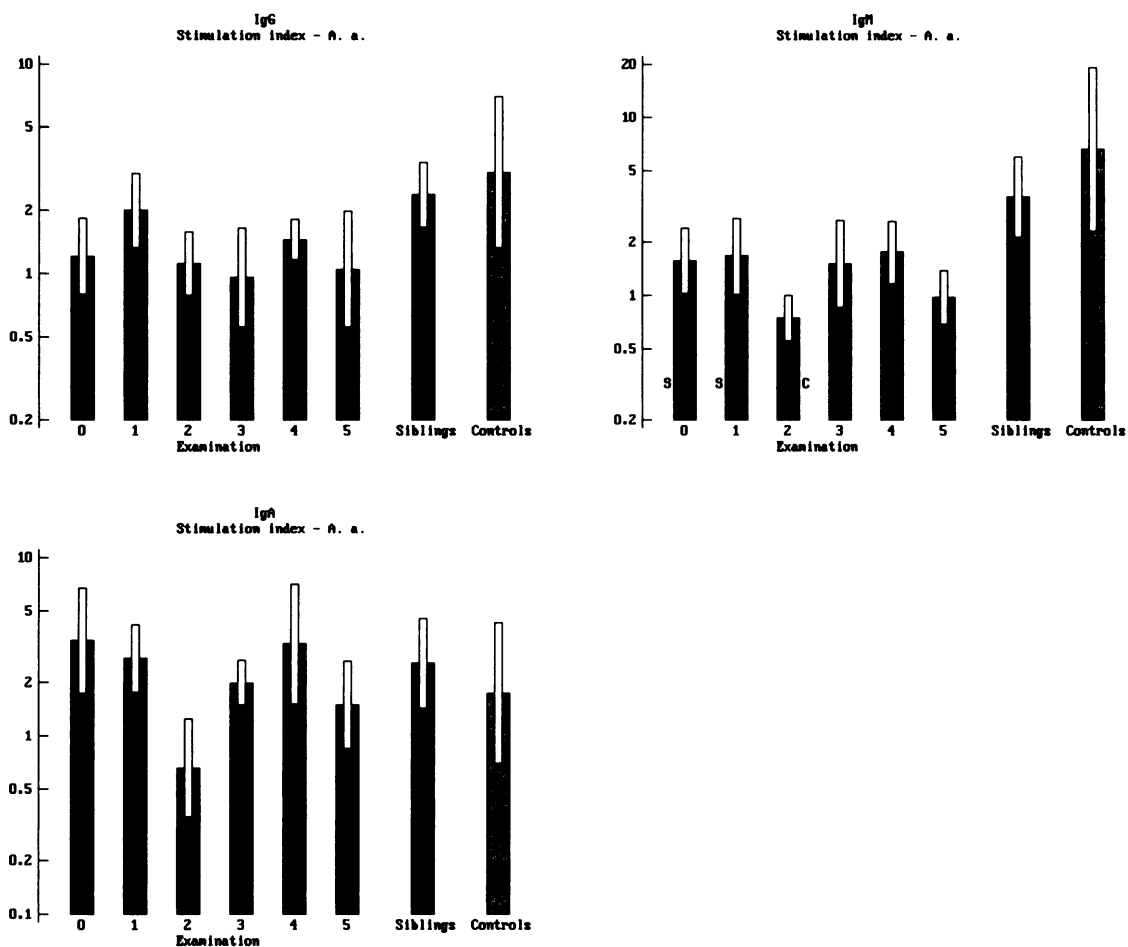
Vyšetření 0- vstup, 1-1.rok, 2 – 4.rok, 3 – 6.rok, 4- 8.rok, 5 – 10.rok

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (C)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi pacienty a jejich sourozenci (S)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantního účinku bakteriální stimulace ↑

Graf č. 11 - Produkce imunoglobulinů po stimulaci standardním kmenem *A. a.*



Geometrický průměr stimulačních indexů včetně SD.

Vyšetření 0- vstup, 1-1.rok, 2 - 4.rok, 3 - 6.rok, 4- 8.rok, 5 - 10.rok

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (C)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi pacienty a jejich sourozenci (S)

Závěry: Signifikantně vyšší produkce IgM po stimulaci *E. coli* byla opakovaně detekována u zdravých osob než pacientů. Zároveň byla opakovaně detekována signifikantně vyšší produkce IgM po stimulaci *A. a.* u zdravých osob a zdravých sourozenců než u pacientů.

7.5. Experimentální část č. 5

7.5.1. *Produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM a PWM+ConA u pacientů s časnou parodontitidou – výsledky dlouhodobé studie*

Bártová a spol. (1985) sledovala produkci imunoglobulinů po mitogenní stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z krve pacientů s progresivní a mírnou parodontitidou dospělých a z krve zdravých osob. Zjistila, že u zdravých osob a pacientů s mírnou parodontitidou dochází k signifikantnímu poklesu tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA vzhledem ke stimulaci PWM. Naopak u pacientů s progresivním onemocněním k inhibici tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA stimulaci nedochází, naopak jejich koncentrace byla po PWM+ConA stimulaci vyšší než po stimulaci PWM. Hodnota inhibice se zjišťuje pomocí inhibičního indexu, který se počítá dle vzorce $\text{Inhibition index} = [\text{PWM} - (\text{PWM} + \text{ConA}) / \text{PWM}] \times 100$ a uvádí se v procentech.

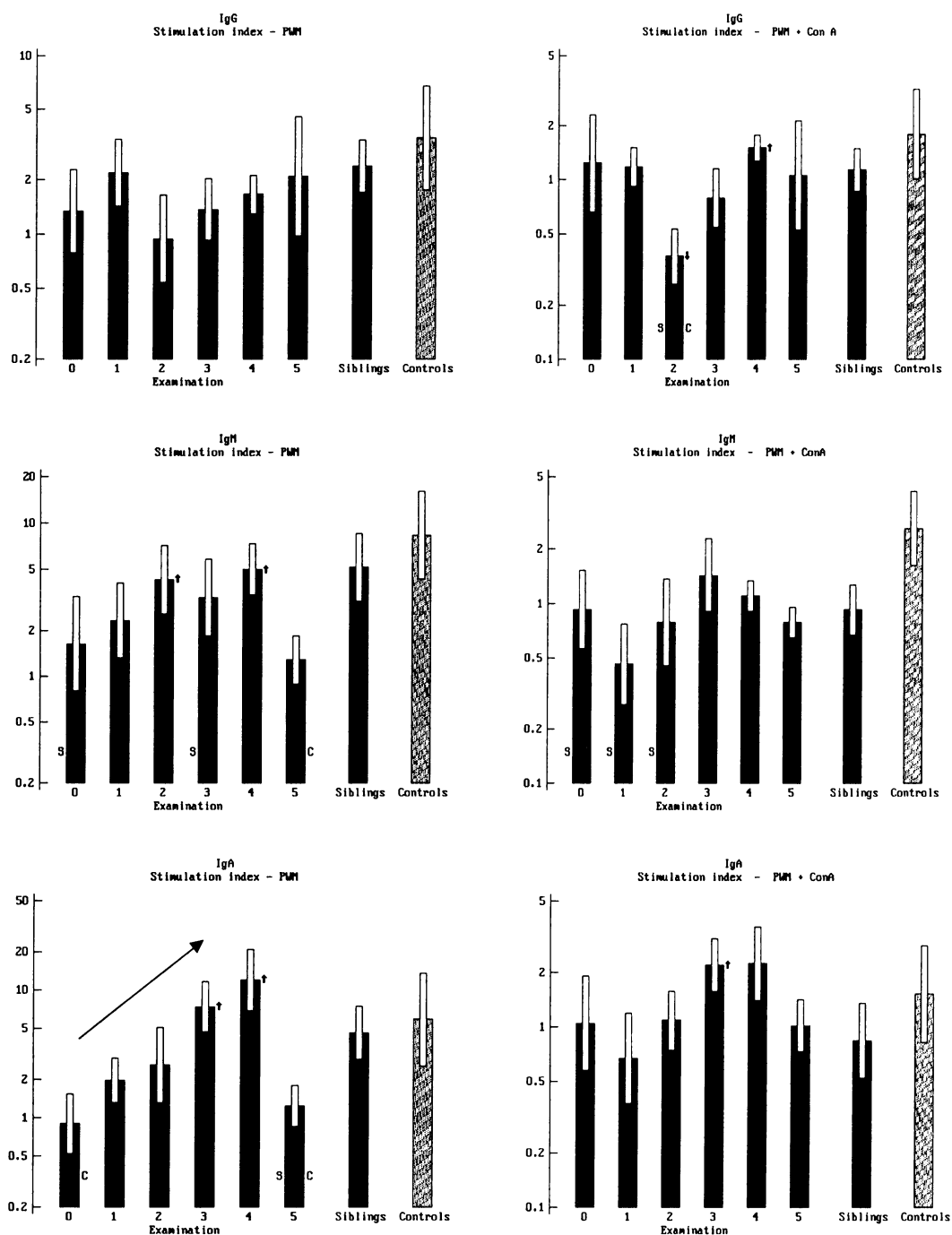
Tvorba imunoglobulinů po *in vitro* stimulaci mononukleárních buněk s PWM a PWM+ConA byla sledována u pacientů s EOP od počátku jejich terapie a byla zjišťována také u zdravých sourozenců pacientů a zdravých kontrolních osob.

V Grafu č. 11 jsou uvedeny hodnoty geometrických průměrů produkce IgG, IgM a IgA po stimulaci PWM a PWM+ConA v průběhu 10letého období. Pomocí párového Studentova t-testu (při hladině významnosti $p=0,05$) byl zjišťován signifikantní vzestup nebo pokles produkce imunoglobulinů po mitogenní stimulaci vzhledem k hladinám detekovaným v nestimulované kultuře a nebo po PWM a PWM+ConA stimulaci. Pomocí párového Studentova t-testu byly zjišťovány signifikantní rozdíly v tvorbě imunoglobulinů mezi pacienty a jejich sourozenci, naopak pomocí nepárového Studentova t-testu byly zjišťovány signifikantní rozdíly mezi pacienty a zdravými osobami.

U pacientů byla na počátku jejich léčby zjištěna nízká produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM v porovnání s hladinami zjištěnými u zdravých osob (Graf č. 12). Hladiny IgA a IgG byly u pacientů po stimulaci PWM+ConA vyšší než po PWM stimulaci, nedošlo tedy k inhibici tvorby imunoglobulinů. V průběhu studie došlo u pacientů ke zvýšení produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM, a tedy i ke zvýšení hodnot inhibičního indexu.

V průběhu prvního až osmého roku studie došlo u pacientů k signifikantnímu nárůstu produkce IgA (Graf č. 12) po PWM stimulaci. Tento výsledek je velmi důležitý, jelikož IgA má ochrannou funkci v organismu a jeho nárůst byl spojen se zlepšením klinického stavu pacientů.

Graf č. 12 - Produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM a PWM+ConA.



Geometrický průměr stimulačních indexů včetně SD.

Vyšetření 0- vstup, 1-1.rok, 2 – 4.rok, 3 – 6.rok, 4- 8.rok, 5 – 10.rok, Siblings = zdraví sourozenci, Controls = zdravé kontroly

Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty (C)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi pacienty a jejich sourozenci (S)

Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní stimulace (†), případně inhibice (‡)

Regresní analýzou byl zjištěn signifikantní růst produkce IgA v průběhu 0. – 8. roku studie

Hodnoty inhibičních indexů jsou uvedeny v Tab. č. 13. U zdravých osob a sourozenců byla zjištěna signifikantní inhibice tvorby IgA a IgM. Došlo také k inhibici tvorby IgG, ale tato nebyla signifikantní.

U pacientů byla na počátku léčby zjištěna porucha v inhibici imunoglobulinů. Záporné hodnoty inhibičních indexů znamenají, že hladiny imunoglobulinů byly po stimulaci PWM nižší než po stimulaci PWM+ConA. Po zahájení terapie došlo k upravení imunitní reakce. Signifikantní inhibice tvorby IgA a IgM byla zjištěna v prvním, čtvrtém a osmém roce léčby pacientů.

Signifikantně nižší hodnoty inhibice tvorby IgM byly zjištěny v šestém roce u pacientů v porovnání se zdravými sourozenci. Signifikantně nižší inhibice tvorby IgA byla zjištěna na počátku a na konci studie u pacientů v porovnání se zdravými kontrolami.

Tabulka č. 13 - Hodnoty inhibičních indexů

	vstup	1.rok	4.rok	6.rok	8.rok	10.rok
IgG						
Zdravé kontroly	53 %					
Sourozenci	48 %					
Pacienti	- 9 %	47 %	61 %	83 %	10 %	50 %
IgM						
Zdravé kontroly	83 %*					
Sourozenci	69 %*					
Pacienti	44 %	81 %*	82 %*	37 % ^S	78 %*	39 %
IgA						
Zdravé kontroly	80 %*					
Sourozenci	79 %*					
Pacienti	- 21 % ^K	67 %*	73 %*	64 %	82 %*	18 % ^K

* - Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke zjištění signifikantní inhibice

K - Nepárový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi kontrolami a pacienty

S- Párový Studentův t-test ($p=0,05$) byl použit ke stanovení signifikantních rozdílů mezi pacienty a jejich sourozenci

Závěry: Na počátku terapie byly zjištěny poruchy inhibice polyklonální tvorby IgA a IgG. Po provedení konzervativní terapie došlo u většiny pacientů k obnovení inhibice, avšak v desátém roce studie byla opět detekována porucha inhibice IgA u pacientů.

7.5.2. Vztah mezi progresí onemocnění parodontu a inhibicí tvorby imunoglobulinů

Cílem této části studie bylo zjistit, zda snížená inhibice tvorby imunoglobulinů souvisí se zhoršením stavu parodontu u pacientů s časnou parodontitidou.

V Tab. č. 14 jsou schematicky znázorněny výsledky vyšetření, která byla provedena u jednotlivých pacientů v průběhu desetileté studie. Podle průměrných hodnot inhibičních indexů zjištěných u zdravých osob jsme rozdělili hodnoty inhibičních indexů do tří kategorií. Jako normální (fyziologická) inhibice byla považována inhibice >75 %. Za sníženou inhibici byly považovány hodnoty inhibičních indexů od 0 do 50 %. Třetí skupinu tvořily inhibiční indexy se zápornou hodnotou tzn. že produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM+ConA byla vyšší než po PWM stimulaci.

V Tab. č. 14 jsou dále uvedena procentuální zastoupení normálních, snížených a záporných inhibičních indexů pro jednotlivé imunoglobuliny u pacientů s mírnou formou parodontitidy (skupina A), s horší formou parodontitidy (skupina B), u zdravých sourozenců a zdravých kontrolních osob. Mezi jednotlivými skupinami nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Nicméně pacienti ze skupiny A častěji inhibovali tvorbu IgG a IgM než pacienti skupiny B, a naopak pacienti ze skupiny B častěji inhibovali tvorbu IgA než pacienti ze skupiny A.

Na základě hodnot inhibičních indexů byli pacienti rozděleni do dvou skupin nezávisle na jejich klinickém stavu. V Tab. č. 15 jsou uvedeny počty pozorování v %, při kterých byla u daného pacienta zjištěna normální inhibice (inhibice >75 %) pro IgA, IgM a IgG. jednotlivé imunoglobuliny. Z těchto tří hodnot bylo poté vypočítáno průměrné procento inhibice, a pacienti byli seřazeni podle této hodnoty. Z této tabulky je zřejmé, že mezi poruchou inhibice tvorby imunoglobulinů a klinickým stavem pacientů s časnou parodontitidou bohužel neexistuje žádná korelace.

Tabulka č. 14 Schematické znázornění inhibice tvorby imunoglobulinů po stimulaci PWM a PWM+ConA - rozdělení pacientů na skupinu A s dobrým klinickým stavem, skupinu B s progresí onemocnění, skupinu sourozenců a kontrol.

Pacient	Skupina	IgG			IgM			IgA		
		> 75 %	0 - 50 %	< 0 %	> 75 %	0 - 50 %	< 0 %	> 75 %	0 - 50 %	< 0 %
6	A	00		00	0000			0000		
2	A	00	00	0	0000	0		000	00	
5	A	00	0		000			00		0
9	A	00	00	0	000	0		0	0	000
4	A	00		0	0	00		0		00
1	A	0	00	0	00	0	0	000		0
8	A	0	00	0	000				0000	
7	A	0	00	00	00	000		0	000	0
10	A	0	000	0	0	00	0	0	00	00
3	A		00		0	00		0	0	0
		35 %	40 %	25 %	63 %	29 %	5 %	41 %	32 %	27 %
18	B	000000	0	00	00000	00	00	000000	000	
20	B	00	0000	0	00000		00	0000	0	00
12	B	00	00	00	00000			000	0	00
16	B	00	00	00	0000		00	00	0	00
17	B	00	0	0	000	0		00	0	0
19	B	00	000	00	000	0000		00	0000	0
11	B	0	00	0000	000	00	00	00000	0	0
15	B	0	00	0	00	00		00	0	0
13	B		00	0	00	0		00		0
14	B		00	0	0	0	0	0	00	
		32 %	38 %	30 %	60 %	24 %	16 %	53 %	27 %	20 %
Sourozenci										
1		0	00		0		0	0		00
2			00	0		000			000	
3		0000	00	00	000	000	00	0	00000	00
4		00			00			0	0	
5			0000		000	0		000	0	
6		0			0			0		
7				00	00			0	0	
8		0		0	00			0	0	
		36 %	40 %	24 %	58 %	29 %	13 %	36 %	48 %	16 %
Kontroly		00000	00000	00000	00000	00000	00	00000	00000	000
		00		0	00			00000		
		39 %	28 %	33 %	50 %	36 %	14 %	56 %	28 %	17 %

Tabulka č. 15 Výskyt normální inhibice tvorby imunoglobulinů (inhibice > 75 %) u jednotlivých pacientů a hodnoty „průměrné inhibice“ u jednotlivých pacientů

Pacienti s dobrou inhibicí imunoglobulinů					
Pacient	Skupina	IgG	IgM	IgA	Průměr
6	A	50,0	100	100	83,3
5	A	66,6	100	66,6	77,8
18	B	66,6	55,5	66,6	62,3
12	B	33,3	100	50,0	61,0
2	A	40,0	80,0	60,0	60,0
17	B	50,0	75,0	50,0	58,3
4	A	66,6	66,6	33,0	55,4
20	B	28,6	71,4	57,1	52,3
1	A	25,0	50,0	75,0	50,0
Pacienti s nízkou inhibicí imunoglobulinů					
Pacient	Skupina	IgG	IgM	IgA	Průměr
16	B	33,3	66,6	40,0	46,6
9	A	40,0	75,0	20,0	45,0
13	B	0	66,6	66,0	44,7
11	B	14,3	42,9	71,0	42,7
8	A	25,0	100	0	41,6
15	B	25,0	50,0	50,0	41,6
7	A	20,0	40,0	20,0	33,3
19	B	28,6	42,8	28,6	33,3
3	A	0	33,3	33,3	22,3
14	B	0	33,3	33,3	22,3
10	A	20,0	25,0	20,0	21,6

Závěry: Porovnáním inhibice tvorby imunoglobulinů s progresí onemocnění u pacientů s časnou parodontitidou se nepodařilo najít závislost mezi výsledkem vyšetření a průběhem onemocnění parodontu.

7.5.3. Inhibice tvorby imunoglobulinů u pacientů s imunodeficitním onemocněním

Naše zkušenosti s vyšetřováním tvorby imunoglobulinů po polyklonální aktivaci i se sledováním inhibice jejich tvorby jsme v rámci spolupráce s MUDr. Kryštůfkovou použili ke zjištění vlivu infúze intravenózních imunoglobulinů (IVIG) na imunitní odpověď u pacientů

se selektivním deficitem IgG podtříd (IgGSD) a běžným variabilním imunodeficitem (CVID). Výsledky této studie jsou součástí publikace: Z. Krátká, J. Bártová, O. Kryštůfková, K. Benetková, L. Mrklas and T. Fučíková **Effect of intravenous immunoglobulins on *in vitro* immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency**. APMIS 2002; 110: 205-13. Publikace je uvedena na straně 115 - 121.

Materiál a metody: Do studie bylo zahrnuto devět pacientů se selektivním deficitem IgG podtřídy (IgGSD) a osm pacientů s běžným variabilním imunodeficitem (CVID) ve věku 27 - 66 let. Pacienti s IgGSD měli snížené hladiny IgG v séru, zatímco pacienti s CVID měli snížené hladiny i dalších imunoglobulinů (Tab. č. 1 v příložené publikaci). Většina z pacientů trpěla chronickými infekcemi dýchacích cest, ale i dalšími přidruženými onemocněními. Pacientům byla pravidelně aplikována infúze intravenózních imunoglobulinů (preparát Endobulin), jejíž dávka je uvedena v Tab. č. 1 v publikaci. Současně bylo vyšetřeno 14 zdravých osob ve věku 18 – 28 let.

Pacientům byla odebrána periferní krev těsně před aplikací infúze a týden po aplikaci infúze. Mononukleární buňky byly izolovány z periferní krve a poté byly stimulovány PWM a PWM+ConA. Po sedmidenní stimulaci byly supernatanty odebrány a zamrazeny. Koncentrace IgG, IgM a IgA v supernatantech byly detekovány metodou ELISA. Data byla zlogaritmována a ke statistickým analýzám byly použity hodnoty geometrických průměrů. Pomocí párového Studentova t-testu byly zjišťovány signifikantní rozdíly v produkci imunoglobulinů po stimulaci a v nestimulovaných kulturách, a také signifikantní rozdíly koncentrace imunoglobulinů před a po aplikaci infúze. Nepárový Studentův t-test byl použit k detekci signifikantních rozdílů mezi pacienty s IgGSD, CVID a zdravými kontrolami.

Výsledky:

Průměrná koncentrace IgM, IgG a IgA u pacientů před a po infúzi a také u zdravých kontrol jsou uvedeny v Grafu č. 1 v publikaci. Signifikantně vyšší hladiny IgM a vyšší hladiny IgA a IgG po stimulaci PWM byly zjištěny u pacientů s IgGSD před infúzí než u zdravých osob. Působením infúze došlo u IgGSD pacientů po PWM stimulaci k poklesu produkce IgM i IgA, ale k vzestupu IgG. U CVID pacientů byly detekovány po PWM stimulaci vyšší hodnoty IgM a IgG, ale nižší hladiny IgA než u zdravých kontrol. Působením infúze u CVID pacientů došlo po PWM stimulaci k poklesu pouze produkce IgM. Po infúzi byla u obou skupin pacientů ve všech stimulacích (s výjimkou PWM stimulace u CVID pacientů) detekována signifikantně vyšší koncentrace IgG než u zdravých osob.

Signifikantní inhibice tvorby polyklonálních imunoglobulinů IgA, IgG a IgM po stimulaci PWM+ConA než po stimulaci PWM byla zjištěna pouze u zdravých osob (Tab. č. 2 v publikaci). U většiny pacientů s IgGSD vedla infúze k poklesu tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA stimulaci, naopak u většiny CVID pacientů došlo po infúzi ke zvýšení tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA stimulaci. Signifikantní inhibice tvorby IgM byla zjištěna u IgGSD pacientů před i po infúzi a u CVID pacientů pouze po infúzi. U IgGSD pacientů byly zjištěny po infúzi signifikantně nižší hodnoty inhibičního indexu pro IgA než u zdravých kontrol.

Negativní hodnoty inhibičních indexů pro IgG byly zjištěny u 5/8 IgGSD pacientů před infúzí, ale pouze u 3/8 pacientů IgGSD pacientů po infúzi. Naopak negativní hodnoty inhibičních indexů pro IgG byly zjištěny pouze u 1/7 CVID pacientů před infúzí, avšak u 6/7 pacientů po infúzi. Po aplikaci infúze byly u IgGSD pacientů zjištěny signifikantně vyšší hodnoty inhibice IgG než u CVID pacientů.

K inhibici tvorby IgA došlo u 6/8 IgGSD pacientů před infúzí, ale u 5/8 po infúzi. Působením infúze došlo k výraznému poklesu hodnot inhibičních indexů u 6/8 IgGSD pacientů. Naopak inhibice tvorby IgA byla detekována pouze u 3/7 CVID pacientů před infúzí, ale u 4/7 pacientů po infúzi. Působením infúze se hodnoty inhibičních indexů zvýšily u 5/7 CVID pacientů.

K inhibici tvorby IgM došlo u 8/9 IgGSD a u 5/7 CVID pacientů před infúzí. Po infúzi došlo k inhibici tvorby IgM již u 15/16 pacientů.

Závěry:

Imunomodulační efekt intravenózních imunoglobulinů přetrvává i po sedmi dnech od aplikace infúze. U IgGSD pacientů byla před infúzí zjištěna vysoká tvorba IgA a IgM po *in vitro* mitogenní stimulaci, která poklesla po aplikaci infúze. Naopak byla vlivem infúze došlo k *in vitro* zvýšení produkce IgG u IgGSD a CVID pacientů. Po stimulaci buněk PWM+ConA došlo s signifikantní inhibici tvorby imunoglobulinů u zdravých osob. Působením infúze došlo k inhibici IgG pouze u IgGSD pacientů, naopak u CVID pacientů byla stimulována tvorba IgG. Lymfocyty aktivované ConA produkují supresivní faktory, které spolu s IVIG infúzí ovlivňují stimulaci a inhibici tvorby imunoglobulinů *in vitro*.

7.5.3.1. Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency

APMIS 2002; 110: 205-13
 Published online: 11 October 2002

Copyright © APMIS 2002
 Printed in the United Kingdom
 ISSN 0902-4647

Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency

ZUZANA KRATKA,¹ HŘINA BARTOVÁ,¹ OLINA KRYŠTUŤKOVÁ,² KLARA BENETKOVÁ,¹ LUBOR MRKLAS¹ and TEREZA FUČIKOVÁ³

¹Institute of Dental Research, ²Institute of Rheumatology, ³Institute of Immunology and Microbiology, ¹⁻³Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

Kratka Z, Bartová J, Kryštuřková O, Benetková K, Mrklas L, Fučíková T. Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency. *APMIS* 2002;110:205-13.

Seventeen patients with antibody immunodeficiency (9 subclass IgG immunodeficiencies, 8 common variable immunodeficiencies) and clinically unambiguous immunodeficiency symptomatology participated in the study with 14 healthy donors. The patients were given regular intravenous immunoglobulin (IVIg) infusions with Endobulin. Blood was collected before and 7 days after infusion of the usual IVIg dose. Mononuclear cells were isolated from peripheral blood (PBMC) of the patients by Ficoll-Paque gradient centrifugation. In order to monitor the ability to inhibit or activate polyclonal production of immunoglobulins in vitro, we stimulated PBMC with pokeweed mitogen (PWM) and with a mixture of pokeweed mitogen + concanavalin A (PWM+ConA). We found that an immunomodulatory effect of IVIg persists in vitro even one week after infusion. Polyclonally stimulated IgA and IgM production was suppressed by IVIg infusion mainly in patients with IgG subclass deficiency. The positive stimulatory effect of IVIg infusion on IgG production was confirmed. The IgG production increased in vitro after infusion in both groups of patients and was significantly higher than in healthy donors. Co-stimulation of PWM-stimulated cells with ConA caused an inhibition of immunoglobulin release in normal healthy donors. The infusion supported the capability of ConA to inhibit IgG production in vitro in patients with IgG subclass deficiency, whereas an increase in IgG production with PWM + ConA stimulation after infusion was found in CVID patients. We assume that lymphocytes activated by ConA produce suppressive factors, which can be affected by the IVIg infusion and which can have both an immunostimulatory and an immunosuppressive effect.

Key words: IgG subclass deficiency; polyclonal activation; intravenous immunoglobulin; pokeweed mitogen; concanavalin A.

Kratka, Zuzana, Institute of Dental Research, Vnitřnířadská 48, 120 00 Prague 2, Czech Republic, e-mail: zkratka@post.cz

Decreased production of immunoglobulins with normal or lower numbers of immunocompetent cells is characteristic for patients with primary immunodeficiency (1). Patients with IgG subclass deficiency (IgGSD) show normal total

serum IgG levels with subnormal levels of one or more IgG subclasses. CVID patients typically have low serum IgG and IgA concentrations. This includes IgG subclasses, either with or without low serum IgM levels (1, 2). CVID patients may have reduced B cell numbers and CD4/CD8 ratios.

In general recurrent pyogenic sinopulmonary

Received August 7, 2000.
 Accepted November 1, 2001.

infections are commonly seen in these patients (1, 3). Early diagnosis is important: some patients are only discovered when they have significant chronic lung disease, including bronchiectasis. CVID patients are also highly prone to the following: gastrointestinal infections caused by *Giardia lamblia* and *Campylobacter jejuni*, lymphoreticular and gastrointestinal malignancies, or to a variety of autoimmune disorders, e.g. pernicious anaemia, haemolytic anaemia, thrombocytopenia and neutropenia.

Intravenous immunoglobulin (IVIG) is the preferred treatment for patients with antibody deficiencies (1, 3, 4) but also for patients with non-infectious immune-mediated disorders, e.g. autoimmune thrombocytopenic purpura, myasthenia gravis, Kawasaki disease, and systemic lupus erythematosus (5). IVIG for therapeutic use is normally polyspecific immunoglobulin G prepared from plasma of over 10,000 healthy donors. The mechanism of action of IVIG has not been clearly established, but immunomodulatory effects include antigen neutralization, binding to microbes and facilitating opsonization, binding to Fc-receptors, modulating cytokine synthesis and release (2, 6).

As most of the specialised studies on the effect of IVIG therapy monitored for a maximum of 4 days after the IVIG was applied to patients (7, 8), we focused our study on the effects of IVIG on immunoglobulin production by cells isolated from peripheral blood one week after infusion. In order to monitor the change in the ability to inhibit or activate polyclonal production of immunoglobulins *in vitro*, we stimulated these cells with pokeweed mitogen (PWM) and with a mixture of pokeweed mitogen and concanavalin A (PWM+ConA). We used these mitogens in our studies (9, 10) when we found that co-cultivation of lymphocytes with PWM+ConA suppresses polyclonal immunoglobulin production in healthy donors but not in patients with chronic inflammatory disease – an early onset periodontitis.

MATERIALS AND METHODS

Examined individuals

Seventeen patients (13 females and 4 males between the ages of 27 and 66) with antibody immunodeficiency and clinically unambiguous immunodeficiency

symptomatology and 14 healthy donors (age range 18–28 years) participated in the study. In the patient group, nine cases were classed as subclass IgG immunodeficiencies (IgGSD) and eight as common variable immunodeficiencies (CVID). All patients were given a thorough clinical examination, especially looking at the state of the lung affliction, and were given regular intravenous immunoglobulin (IVIG) infusions with Endobulin. Patient characteristics, immunoglobulin levels in sera measured before the study, lung findings, associated symptoms of lymphatic tissue activation, autoimmune and chronic inflammatory diseases are summarized in Table 1.

Arithmetic mean serum IgG level before the study was in IgGSD patients 7.32 g/l (range 2.13–11.50) and in CVID patients 4.76 g/l (range 3.98–8.65). Mean IgM level was 1.05 g/l in IgGSD patients (range 0.48–1.97) and 0.48 g/l in CVID patients (range 0.13–1.04). Mean IgA level was 0.99 g/l in IgGSD patients (range 0.50–2.08) and 0.64 g/l in CVID patients (range 0.07–2.40).

In accordance with the Helsinki Convention (1964), informed consent was obtained regarding blood collection for immunological examination.

Methods

Blood was collected before and 7 days after infusion of the usual IVIG dose (Table 1). Mononuclear cells were isolated from the peripheral blood of the patients by Ficoll-Paque gradient centrifugation. Cells were washed and then diluted with X-VIVO medium (BIO-WHITTAKER) to a concentration of 10^6 cells/ml. These cells were cultivated for 7 days with pokeweed mitogen (PWM Sigma, 2 µg/ml), and with pokeweed mitogen with concanavalin A (PWM 2 µg/ml + ConA, Sigma 10 µg/ml).

Levels of immunoglobulins (IgG, IgA, and IgM) in supernatants were measured by ELISA. Polyclonal antibodies Q-SwaHu-IgM, Q-SwaHu-IgG or Q-SwaHu-IgA (Sevac, Prague) were used as binding antibodies. After incubation and washings, control sera with defined immunoglobulin contents and supernatants were applied. Following incubation and washing, peroxidase-labelled antibodies against human immunoglobulin (Q-SwaHu-IgM/px or Q-SwaHu-IgG/px or Q-SwaHu-IgA/px) were added. A 1-h incubation at room temperature was followed by washing of the plates and redox reaction with OPD in phosphate ELISA buffer (pH = 6.2), which was developed using hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1 M sulphuric acid and read on a SLT Spectra II ELISA reader. Individual samples were evaluated (µg/ml) using KIME 1 software.

Statistical evaluation

All data were transformed logarithmically before statistical evaluation. To compare the stimulated samples with the non-stimulated, and to compare the effect of the infusion, Student's paired t-test was used.

IVIG AND IN VITRO IMMUNOGLOBULIN FORMATION

TABLE I. Basic data of 17 patients with antibody immunodeficiency

No.	Sex	Age	Dg ^a	IgM ^b (g/l)	IgG (g/l)	IgA (g/l)	Symptoms (years)	Pulmonary diagnosis ^c	Symptoms of immunopathology tumors	IVIG (mg/kg/month)	Other therapy
1	f	66	1	0.48	5.38	2.08	14	COPD		240	
2	f	47	1	1.17	9.90	0.88	1	COPD	Raynaud's syndrome	330	i.v. corticoids
3	f	59	1	1.34	5.75	0.68	7	CB	Rheumatoid arthritis	200	antimalarial
4	f	27	1	1.19	11.50	1.63	10	AB	Myopathy-undetermined aetiology	100	
5	f	30	1	1.10	6.04	0.75	18	AB		40	
6	m	55	1	0.66	5.62	0.77	7	COPD	Thyroiditis	50	
7	f	35	1	0.68	8.26	0.50	4		Proctocolitis	240	
8	f	33	1	0.90	5.21	0.83	2		Sclerosis multiplex	290	
9	f	52	1	1.97	8.25	0.77	0.5	CB	Exudative pericarditis, Diabetes mellitus type II	220	p.o. corticoids
10	f	44	2	0.54	3.98	0.54	7			330	
11	f	50	2	0.30	5.73	0.19	29	AB, BE	Hysterectomy due to carcinoma	330	i.v. corticoids
12	f	38	2	0.68	2.94	0.79	2		Nodular hyperplasia of GIT, lymphangiectasia, splenomegaly	190	
13	m	64	2	0.22	4.10	0.29	29		Alopecia, unspecified skin tumor	50	
14	m	54	2	0.13	4.17	0.07	9	COPD	Coeliac	370	
15	m	37	2	0.68	4.22	0.75	8	COPD		370	p.o. corticoids
16	f	28	2	0.22	4.31	0.07	19	BOOP	Proctocolitis	340	p.o. corticoids
17	f	62	2	1.04	8.65	2.40	0.50		Thyroiditis, Erythema nodosum	90	

^aDiagnosis: 1 - subclass IgG deficiency, 2 - common variable immunodeficiency.

^bImmunoglobulin levels were measured in sera of patients before the study.

^cPulmonary disease: AB - asthma bronchiale, CB - chronic bronchitis, BE - bronchiectasis, COPD - chronic obstructive pulmonary disease, BOOP - bronchiolitis obliterans organizing pneumonia.

TABLE 2. Inhibition of *in vitro* IgG (a), IgA (b) and IgM (c) production after PWM + ConA co-stimulation before and after IVIG infusion.

a

Normal donors				IgGSD patients				CVID patients			
				Before	After	Effect					
K1	4.7	K8	-42.2	1	98.8	61.5	↓	10	30.9	-198.4	↓
K2	94.4	K9	59.9	2	232.6	104.3 ↑		11	62.7	-1045.0	↓
K3	41.6	K10	84.5	3	-1.7	59.3 ↑		12	90.3	-8.0	↓
K4	12.0	K11	79.4	4	-18.2	-416.4	↓	13	1.5	-853.7	↓
K5	32.0	K12	89.9	5	24.7			14	24.2	-473.0	↓
K6	52.7			6	-97.5	85.0 ↑		15	28.5	49.8 ↑	
K7	68.2			7	42.1	3.3	↓	16	-31.6	-1960.6	↓
				8	51.5	-1.3	↓				
				9	-90.5	10.0 ↑					
No	12			No	9	8	50% ↓	No	7	7	86% ↓
Mean	48.1 ^a			Mean	-24.8	-37.9 ^b	50% ↓	Mean	29.5	641.3 ^d	14% ↑
SD	40.9			SD	100.9	163.6		SD	39.5	713.2	
SE	11.8			SE	33.6	57.8		SE	14.9	269.6	

b

Normal donors				IgGSD patients				CVID patients			
				Before	After	Effect					
K1	-30.8	K8	96.3	1	99.7	-166.7	↓	10	99.1	-223.9	↓
K2	71.9	K9	96.6	2	57.9	35.9	↓	11	-14.3	19.4 ↑	
K3	75.8	K10	73.7	3	35.8	8.9	↓	12	-913.2	-14.0 ↑	
K4	67.7	K11	98.2	4	96.1	3.2	↓	13	122.0	63.2 ↑	
K5	100.0	K12	89.6	5	71.3			14	27.3	42.1 ↑	
K6	98.7			6	98.2	81.6	↓	15	98.1	-781.9	↓
K7	95.9			7	98.1	-66.2	↓	16	-344.4	90.6 ↑	
				8	-2087.5	12.2 ↑					
				9	200.0	162.5 ↑					
No	14			No	9	8	75% ↓	No	7	7	29% ↓
Mean	75.8 ^a			Mean	192.3	-31.7 ^b	25% ↓	Mean	-167.1	-114.9	71% ↑
SD	37.3			SD	717.0	91.6		SD	363.4	311.9	
SE	11.2			SE	239.0	32.4		SE	137.4	117.9	

c

Normal donors				IgGSD patients				CVID patients			
				Before	After	Effect					
K1	71.8	K8	41.2	1	99.7	55.6 ↑		10	99.5	63.5	↓
K2	95.3	K9	16.2	2	56.9	-4.0	↓	11	0.0	53.0	↓
K3	67.2	K10	97.1	3	11.2	96.7 ↑		12	99.7	34.5	↓
K4	-2.4	K11	91.4	4	97.1	89.9	↓	13	79.1	90.6 ↑	
K5	86.3	K12	94.7	5	80.2			14	-49.0	33.3 ↑	
K6	90.8			6	99.5	74.8	↓	15	-254.7	60.2 ↑	
K7	97.0			7	15.2	75.7 ↑		16	98.4	47.8	↓
				8	79.9	23.1	↓				
				9	-14.0	85.8 ↑					
No	12			No	9	8	50% ↓	No	7	7	57% ↓
Mean	58.6 ^a			Mean	58.4 ^a	62.2 ^a	50% ↑	Mean	29.5	57.7 ^b	43% ↑
SD	53.4			SD	43.5	35.5		SD	39.5	19.6	
SE	15.4			SE	14.5	12.5		SE	14.9	7.4	

The inhibition index was evaluated as percent inhibition of immunoglobulin formation according to the formula:

$$\text{Inhibition index} = \frac{\text{PWM} - (\text{PWM} + \text{ConA}) \times 100}{\text{PWM}}$$

at a probability level of $p=0.05$. Student's non-paired t-test at the same probability level was used to evaluate the differences between patients and controls.

Inhibition of polyclonally produced immunoglobulins (Tables 2a-c) was determined after a simultaneous cultivation of isolated mononuclear cells with PWM + ConA according to Karsch et al. (11) and Hlaskalova-Hogenova et al. (9). The inhibition index was evaluated as a percent of the inhibition of immunoglobulin formation according to the formula:

$$\text{Inhibition index} = \frac{\text{PWM} - (\text{PWM} + \text{ConA})}{\text{PWM}} \times 100$$

The inhibition indexes of patients and normal donors were then compared using Student's non-paired t-test at a probability level of $p=0.05$.

RESULTS

As shown in Fig. 1a-c, purified mononuclear cells from normal subjects, IgGSD and CVID patients produced immunoglobulin if cultivated for 7 days with PWM or PWM + ConA.

High IgM production in patients was decreased after infusion (Fig. 1a)

Before infusion, a significantly higher level ($p=0.05$) of IgM was found in IgGSD patients compared with normal donors on PWM stimulation. In CVID patients, less IgM was produced than in IgGSD but more than in normal donors. Average levels of IgM in PWM stimulations were decreased due to the effect of infusion. We did not find any significant differences in the PWM + ConA stimulation. A significant drop in IgM level was found after infusion in non-stimulated cells of CVID patients.

Increase in IgG production was found in patients after infusion (Fig. 1b)

The cells of patients produced more IgG compared with the cells of normal donors. The PWM + ConA stimulation influenced IgG production more than PWM stimulation. Signifi-

cantly higher levels of IgG before infusion were found in PWM + ConA co-cultivated cells of IgGSD patients and in non-stimulated cells of CVID patients compared with healthy donors. As infusion caused a rise in IgG production, differences between patients and normal donors became significant in all stimulations except PWM stimulation of CVID patients.

Decrease of IgA production after infusion was detected mainly in IgGSD patients (Fig. 1c)

Before infusion, IgGSD patients produced higher levels of IgA compared with normal donors, but IgA levels decreased after infusion. The slight drop in PWM stimulation and rise in other cultivations after infusion were found in cells of CVID patients.

Inhibition of immunoglobulin production by ConA and effect of infusion (Table 2a-c)

We determined the inhibition of polyclonally produced immunoglobulins using simultaneous cultivation of isolated mononuclear cells with PWM + ConA. The formula for inhibition indexes has been stated previously. Positive values mean that co-stimulation of PWM-stimulated cells with ConA causes an inhibition of immunoglobulin release, while negative values mean a pathological rise of immunoglobulin production by co-stimulated cells.

In normal donors, significant inhibition ($p=0.05$) of immunoglobulin production was found for all isotypes; in patients, significant inhibition was detected only for the IgM isotype (except for CVID patients before infusion).

Significantly higher values of inhibition indices of IgG were found after infusion in IgGSD patients compared with CVID patients. A significantly lower inhibition of IgA was detected in IgGSD patients after infusion compared with normal donors. No significant differences were found in IgM inhibition among these groups.

Negative inhibition indices for IgG immunoglobulin (Table 2a) predominated (5/8) in pa-

^aSignificant effect of PWM + ConA stimulation compared to PWM stimulation (Student's paired t-test, $p=0.05$).

^bSignificant differences between the group of IgGSD and CVID patients (Student's non-paired t-test, $p=0.05$).

^cSignificant differences between the group of patients and normal donors (Student's non-paired t-test, $p=0.05$).

^dSignificant effect of infusion (Student's paired t-test, $p=0.05$).

Decrease or increase in inhibition indices due to effect of IVIG infusion symbolized by ↓ and ↑, respectively.

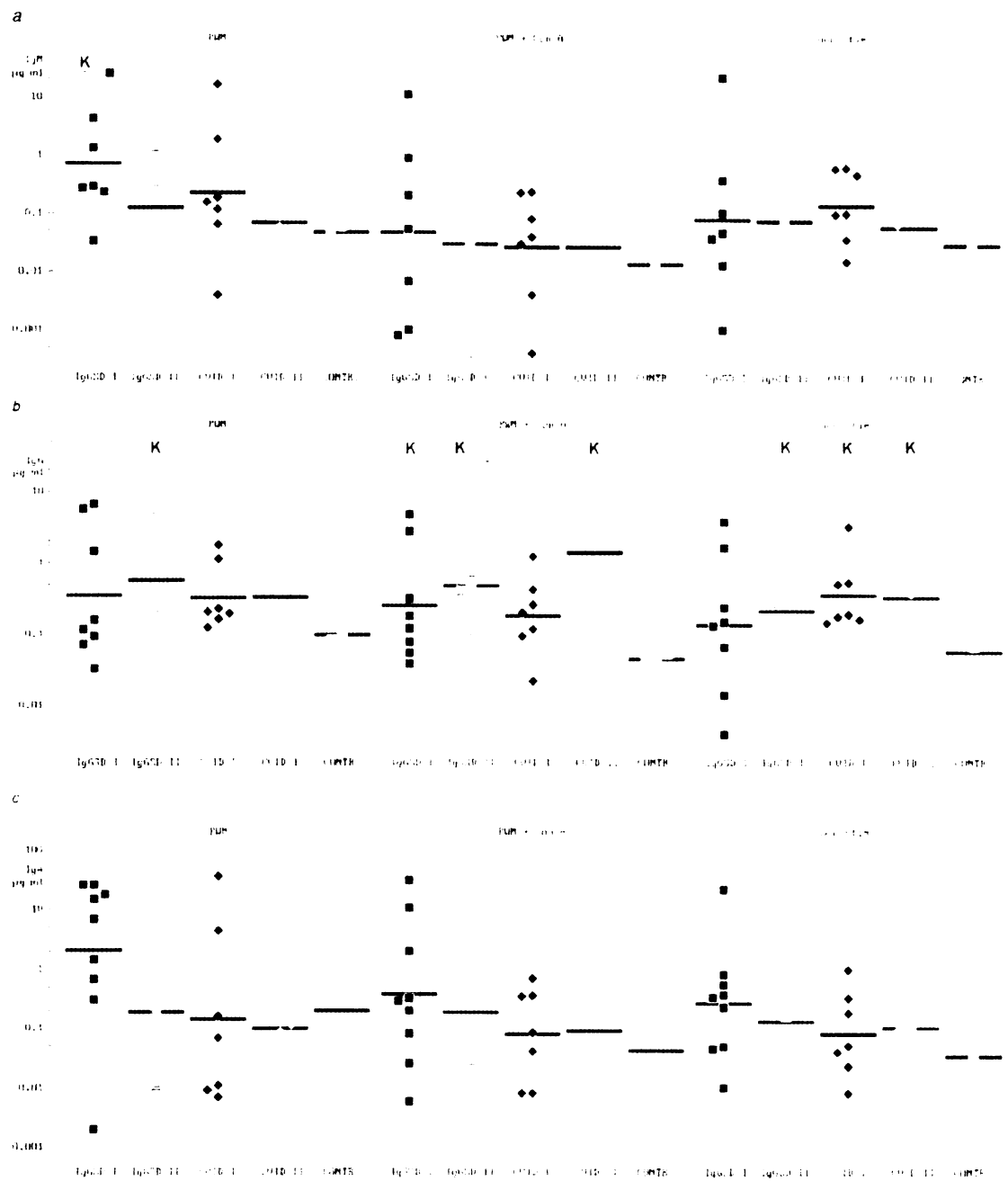


Fig. 1. Effect of IVIG infusion on IgM (a), IgG (b) and IgA (c) synthesis by peripheral blood mononuclear cells from 7 IgGSD patients (■ before, and □ 7 days after IVIG infusion), 7 patients with CVID (◆ before, ◊ 7 days after IVIG infusion) and 14 control persons (K). PBMC samples were cultured 7 days in a X-vivo medium with pokeweed mitogen (PWM) and pokeweed mitogen + concanavalin A (PWM + ConA). Immunoglobulin levels were measured by ELISA. The K - significant difference patients were compared to the controls (Student's non-paired t-test $p < 0.05$).

tients with IgGSD before infusion, whereas after infusion (5/8) indices were positive. An increase in inhibition indices was found in four IgGSD patients and a decrease was ascertained in four patients after infusion. Positive inhibition indices before infusion were found in (6/7) CVID patients. Infusion significantly increased IgG release in co-stimulated cells; therefore, the negative inhibition indices predominated (6/7).

Inhibition of IgA immunoglobulin production (Table 2b) predominated in (6/8) IgGSD patients. After infusion, inhibition indices decreased in (6/8) patients, while in two patients with negative indices increase in inhibition indexes was found.

In contrast, negative indices predominated in (4/7) CVID patients before infusion. Increase in negative values in (5/7) was found after infusion.

Significant inhibition of IgM production was found in IgGSD patients (before and after infusion) and in CVID patients (after infusion). Two originally negative indices in CVID patients were increased after infusion.

DISCUSSION

Intravenous immunoglobulins are used in the treatment of immunodeficiencies and autoimmune disorders. Although many authors have described their positive effect, the mechanism of this effect is still being studied (4).

A short-term effect of IVIG administration has an immunoregulatory character, which influences the production of cytokines and their antagonists, proliferation of T lymphocytes and T-B cell interaction (6, 7, 12-14).

By contrast, our *in vitro* study showed that IVIG has an immunomodulatory effect that still persists a week after infusion. We documented the immunomodulatory effect of IVIG both with respect to the character of the stimulation and the inhibition of immunoglobulin production.

The polyclonally stimulated IgA and IgM production was suppressed by IVIG infusion mainly in patients with an IgG subclass deficiency. As values of these immunoglobulins were significantly higher in patients before infusion than in healthy donors we concluded that

infusion has a strong positive immunoregulatory effect.

Kondo et al. (15) found that IVIG suppresses the immunoglobulin production *in vitro* after stimulation with PWM, by suppressing B-cell functions and affecting functions of antigen-presenting cells. They explained that this suppression was due to the binding of IVIG to Fc receptors of antigen-presenting cells and B-lymphocytes.

The positive stimulatory effect of IVIG infusion was confirmed in IgG production. The IgG levels increased in both groups of patients after infusion. Compared to healthy donors, patients showed significantly higher amounts after infusion.

As early as 1979, it was found that supernatants, obtained after ConA stimulation of human lymphocytes isolated from peripheral blood, could suppress mixed lymphocyte cultures (16). Warrington (17) described a factor produced by ConA-activated T cells, which can suppress the polyclonal immunoglobulin production by B-lymphocytes. In our previous studies, the high immunoglobulin production by peripheral blood lymphocytes in patients with periodontitis which developed after polyclonal stimulation was ascribed to a reduced inhibition of their production (18). In the present study, we examined the inhibition of immunoglobulin production before and one week after infusion in patients with subclass deficiency and with CVID. The inhibition of immunoglobulin production was measured after the lymphocyte stimulation with PWM + ConA (8). Our results imply that infusion has also affected the inhibition of polyclonally produced IgG in the various patients studied. In the group of patients with IgG subclass deficiency, the infusion in most cases brought about a positive shift in the inhibition index, i.e. towards increased inhibition of polyclonally produced immunoglobulins after PWM + ConA stimulation. In contrast, after the CVID patients received an infusion, a PWM + ConA stimulation was followed in most cases (6/8) by a shift in the inhibition index in the negative direction, i.e. towards increased immunoglobulin production.

We assume that lymphocytes activated by ConA produce suppressive factors, which can be affected by the infusion. These suppressive factors have been described in a number of

studies as lymphokines, which can have both an immunostimulatory and a suppressive effect.

Conclusion

Both a positive and a negative immunomodulatory effect were proven after IVIG treatment. We documented the immunomodulatory (immunonormalizing) action of IVIG regarding both the character of stimulation of immunoglobulin production and the inhibition of immunoglobulin production. The fact that IVIG administered *in vivo* inhibits immunoglobulin production induced *in vitro* by a polyclonal activator adequately supports the therapeutic use of IVIG infusions in some immunopathological conditions.

Infusions also affected the ConA-induced inhibition of PWM-stimulated IgG production in the patient study groups. In patients with IgG subclass deficiency, the inhibition index shifted in most cases after infusion in a positive direction, i.e. towards increased inhibition of the polyclonally produced immunoglobulins after PWM+ConA stimulation. On the other hand, the PWM+ConA-induced lymphocyte stimulation brought about, in most cases, a shift in the inhibition index in a negative direction, i.e. towards increased immunoglobulin production in CVID patients after infusion.

This work was financed by CZ Ministry of Public Health IGA grant 4171/3 and 6742/3.

REFERENCES

1. Report of a WHO Scientific Group. Primary Immunodeficiency diseases. *Clin Exp Immunol* 1997;109(Suppl 1):1-24.
2. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1989;9: 22-33.
3. Kainulainen I., Nikoskelainen J., Ruuskanen O. Diagnostic findings in 95 Finnish patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2001;21:145-9.
4. Strand V. Proposed mechanisms for their efficacy of intravenous immunoglobulin treatment. In: Lee ML, Strand V, editors. *Intravenous Immunoglobulins in Clinical Practice*. New York: Marcel Dekker; 1997. 23-36.
5. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune disease with normal polyclonal immunoglobulin G (intravenous immunoglobulin). In: Shoenfeld Y, editor. *The decade of autoimmunity*. Elsevier Science B.V., 1999:409-19.
6. Mouthon L, Kaveri SV, Spalter SH, Lacroix-Desmazes S, Tefrane C, Desai R, Kazatchkine MD. Mechanisms of action of intravenous immune globulin in immune-mediated diseases. *Clin Exp Immunol* 1996;104:3-9.
7. Andersson J, Skansen-Saphir U, Sparrelid E, Andersson U. Intravenous immune globulin affects cytokine production in T lymphocytes and monocytes/macrophages. *Clin Exp Immunol* 1996;104(Suppl 1):10-20.
8. Aukrust P, Froland SS, Laabakk N, Müller F, Nordoy I, Haug C, Espevik T. Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration *in vivo*. *Blood* 1994;84:2136-43.
9. Tlaskalová Hogenová H, Bartová J, Mrklas L, Haníkyřová G. Stimulation of human blood lymphocyte by different polyclonal B cell activators of bacterial and plant origin: production of IgM, IgG and IgA estimated by the ELISA method. *Folia Microbiol (Praha)* 1985;30:258-66.
10. Bartová J, Krátka-Opatrná Z, Prochazková J, Krejsa O, Dušková J, Mrklas L, Tlaskalová H, Cukrowská B. Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Mediators Inflamm* 2000;9:115-20.
11. Karsch J, Watts OS, Osterland CK. Selective immunoglobulin M deficiency in an adult: assessment of immunoglobulin production by peripheral lymphocytes *in vitro*. *Clin Immunol Immunopathol* 1982;25:386-9.
12. Kondratenko I, Amlot PL, Webster ADB, Farrant J. Lack of specific antibody response in common variable immunodeficiency (CVID) associated with failure in production of antigen-specific memory T cells. *Clin Exp Immunol* 1997;108:9-13.
13. Oliva A, Scala E, Quinti I, Paganelli R, Ansouzegui H, Giovannetti A, et al. IL-10 production and CD40L expression in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* 1997;46:86-90.
14. Sewell WA, North ME, Cambronero R, Webster AD, Farrant J. *In vivo* modulation of cytokine synthesis by intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* 1999;116:509-15.
15. Kondo N, Ozawa T, Mushiaki K. Suppression of immunoglobulin production of lymphocytes by intravenous immunoglobulin. *J Clin Immunol* 1991;11:152-8.
16. Kaufman DB, Carnaud C, Stach JL, Bach JF. The suppressive effect of a supernatant from con-

IVIG AND IN VITRO IMMUNOGLOBULIN FORMATION

- canavalin A-activated human lymphocytes: effects of concanavalin A-activated lymphocytes and their supernates on cytotoxic and mixed lymphocyte reactions. *Cell Immunol* 1979;47: 153-62.
17. Warrington RJ. Interaction of lymphokine with normal human macrophages results in release of a suppressor factor for mitogen-induced immunoglobulin synthesis. *Scand J Immunol* 1987; 25:399-407.
18. Bartová J, Tlaskalová-Hogenová H, Mrklas L, Krejsa O, Hankýřová G. Immunomodulating effects of bacterial antigens: polyclonal and specific in vitro activation of B lymphocytes from healthy donors and patients with periodontal disease. In: Ryc M, Franěk J, editors. *Bacteria and Host*. Prague: Avicenum; 1986, 373-6.

7.5.4. Screeningová analýza produkce cytokinů po stimulaci PWM a PWM+ConA pomocí metody RayBio®

Metoda RayBio® umožnila provést screeningové vyšetření až 40 cytokinů v jednom vzorku. Na povrchu membrány byly navázané primární protilátky, prostřednictvím kterých došlo k navázání cytokinů. Podle polohy jednotlivých skvrn byl určen typ cytokinu (Obr. č. 17). Částečnou nevýhodou metody je fakt, že citlivost detekce cytokinů se lišila v závislosti na množství protilátek, které firma navázala na povrch membrány (viz Tab. č. 7).

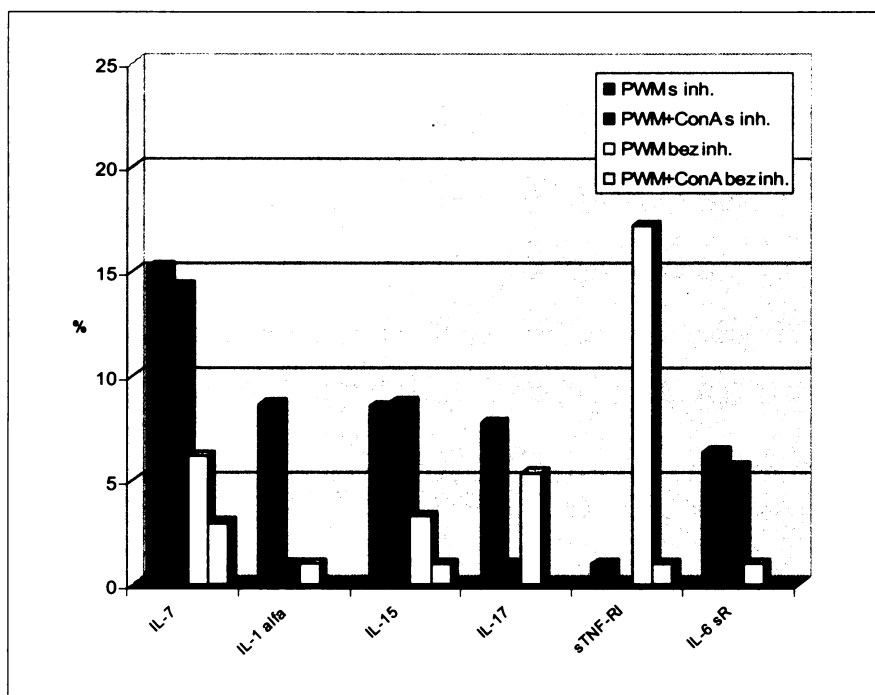
Střední denzita (SD) jednotlivých skvrn byla měřena pomocí softwaru LUCIA G (Laboratory Imaging, Praha). Naměřené hodnoty SD byly vyjádřeny jako procento průměrné hodnoty pozitivní kontroly, aby bylo možné porovnat mezi sebou hodnoty pro daný cytokin naměřené na různých membránách. Vzhledem k různé citlivosti vazby cytokinů nebylo možné určit, kterých cytokinů bylo produkováno více a kterých méně.

V předběžné studii (v roce 2005) byla vyšetřena produkce cytokinů pátý den po stimulaci mononukleárních buněk PWM a PWM+ConA u tří pacientů s EOP s narušenou inhibicí a tří pacientů s EOP s normální inhibicí polyklonální tvorby IgG a IgA. Žádný z vyšetřovaných pacientů neměl v době experimentu akutní zánět v parodontu.

V médiích byly detekovány všechny cytokiny, které daná souprava umožnila vyšetřit. Střední denzita cytokinů IL-2, IL-4, IL-15, IL-17, IFN- γ a TGF- β však byla velmi nízká. Způsobil to zřejmě velmi malé nízký práh citlivosti a nebo došlo po rozmrazení k degradaci cytokinů.

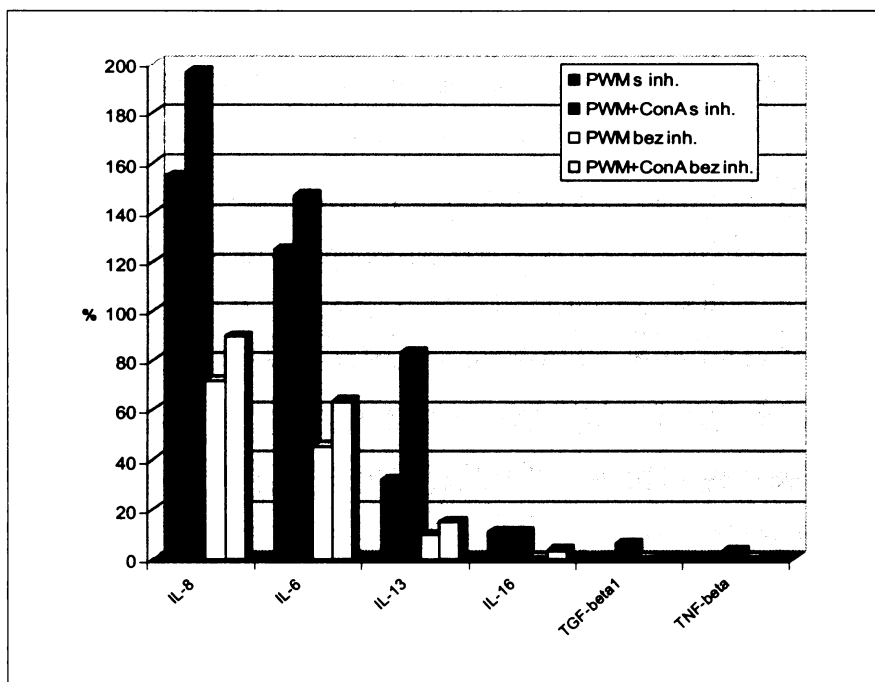
V rámci této studie byly hodnoceny pouze ty cytokiny, které mají vztah k funkci T a B lymfocytů. Po stimulaci PWM bylo detekováno více IL-1 α , IL-7, IL-15, IL-17, s TNF-RI a IL-6 sR než po stimulaci PWM+ConA u obou skupin pacientů (Graf č. 13). Naopak po stimulaci PWM+ConA bylo detekováno více IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TGF- β a TNF- β než po stimulaci PWM u obou skupin pacientů (Graf č. 14). Rozdílná produkce cytokinů po stimulaci PWM a PWM+ConA mezi pacienty s inhibicí a bez inhibice je zřejmá z Grafu č. 15. Vyšší tvorba cytokinů IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-12 p70, TNF- α a IFN- γ byla detekována po PWM než po PWM+ConA stimulaci u pacientů s inhibicí, avšak po PWM+ConA než po PWM u pacientů bez inhibice.

Graf č. 13 - Cytokiny produkované ve vyšší koncentraci po stimulaci PWM než po stimulaci PWM+ConA u osob s inhibicí a bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů



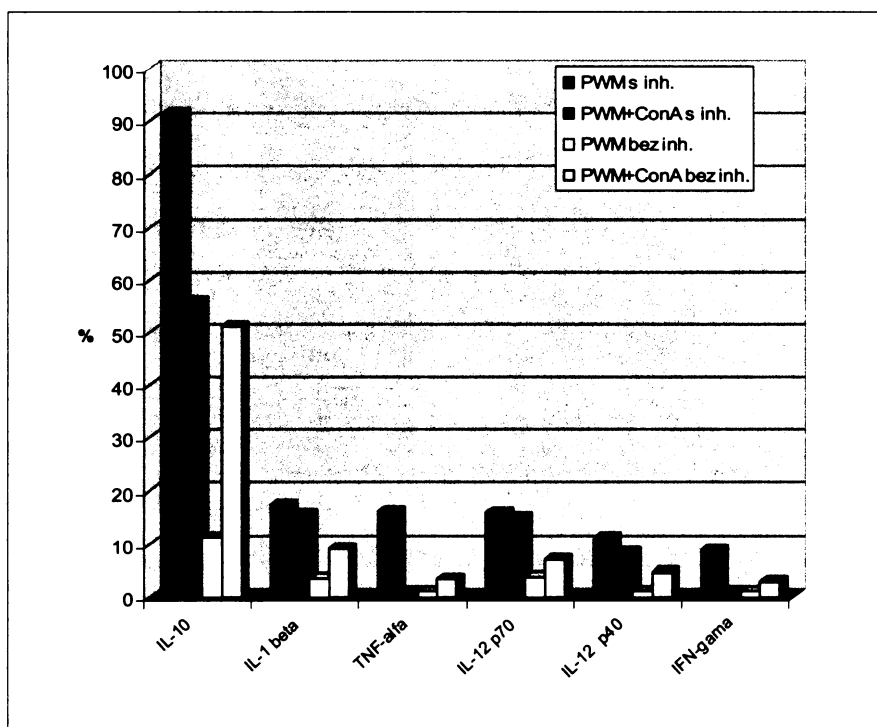
Uvedena je průměrná střední denzita (%) = střední denzita cytokinu / střední denzita pozitivní kontroly

Graf č. 14 - Cytokiny produkované ve vyšší koncentraci po stimulaci PWM+ConA než po stimulaci PWM u osob s inhibicí a bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů



Uvedena je průměrná střední denzita (%) = střední denzita cytokinu / střední denzita pozitivní kontroly

Graf č 15 - Cytokiny produkované ve vyšší koncentraci po PWM než PWM+ConA stimulaci u osob s inhibicí, avšak nižší koncentraci po PWM než PWM+ConA u osob bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů



Uvedena je průměrná střední denzita (%) = střední denzita cytokinu / střední denzita pozitivní kontroly

Závěry:

V rámci předběžné studie byla zavedena metoda RayBio k detekci produkce cytokinů po PWM a PWM+ConA stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pacientů s normální inhibicí a bez inhibice polyklonální tvorby IgA a IgG. Byla zavedena počítačová metoda umožňující analyzovat velikost a střední denzitu jednotlivých skvrn. Po stimulaci PWM se tvořilo u obou skupin pacientů více IL-1 α , IL-7, IL-15, IL-17, s TNF-RI a IL-6sR než po stimulaci PWM+ConA. Naopak po stimulaci PWM+ConA bylo detekováno více IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TGF- β a TNF- β než po stimulaci PWM. U pacientů s inhibicí polyklonální tvorby imunoglobulinů byla po PWM stimulaci zjištěna vyšší tvorba cytokinů IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-12 p70, TNF- α a IFN- γ než po PWM+ConA stimulaci. Naopak u pacientů bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů bylo množství těchto cytokinů vyšší po stimulaci PWM+ConA než po PWM. Výsledky jsou pouze předběžné, neboť skutečné množství cytokinů je nutné stanovit buď metodou ELISA nebo multiplexovou analýzou.

7.5.5. Stanovení koncentrace cytokinů po stimulaci PWM a PWM+ConA pomocí multiplexové analýzy

Po stimulaci mononukleárních buněk s PWM a PWM+ConA byly metodou ELISA zjištěny koncentrace IgG, IgA a IgM. Na základě hodnot inhibičních indexů byli pacienti rozděleni na pacienty s normální inhibicí a bez inhibice. U pacientů bez inhibice byla detekována signifikantně vyšší tvorba IgA po PWM+ConA než po PWM a snížená inhibice IgG po PWM+ConA než po PWM (Tab. č. 16).

Tabulka č. 16 - Koncentrace imunoglobulinů (geometrický průměr v ng/ml) u pacientů s inhibicí a bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů

		Pacienti		
		s normální inhibicí	bez inhibice	
IgA	PWM	250,7	158,1	
	PWM+ConA	52,0	207,3	P=0,05
	inhibice	79,3 %	- 31,1 %	P=0,05
IgG	PWM	988,4	800,9	
	PWM+ConA	418,3	597,5	
	inhibice	58,7 %	35,4 %	
IgM	PWM	184,1	236,0	
	PWM+ConA	12,3	23,0	
	inhibice	93,7 %	91,0 %	

Hodnoceno nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $p=0,05$

Pomocí multiplexové analýzy byla zjištěna koncentrace IL-4, IL-5, IL-10 a TNF- α (pg/ml) v supernatantech získaných po třídenní stimulaci mononukleárních buněk s PWM a PWM+ConA. Koncentrace dalších cytokinů IL-6, IFN- γ a IL-8 byla v řadě vzorků vyšší než hodnoty standardu.

U všech sledovaných cytokinů došlo k poklesu jejich koncentrace po stimulaci PWM+ConA v porovnání s PWM stimulací (Tab. č. 17). Použitím nepárového Studentova t-testu ($p=0,05$) nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v koncentraci jednotlivých cytokinů mezi pacienty s normální a narušenou inhibicí. U pacientů s normální inhibicí bylo však po stimulaci PWM produkováno více IL-10 a TNF- α než u pacientů s narušenou inhibicí, a zároveň po stimulaci PWM+ConA došlo k výraznější inhibici jejich produkce.

Tabulka č. 17 – Koncentrace cytokinů (geometrický průměr pg/ml) po PWM a PWM+ConA stimulaci stanovená multiplexovou analýzou u pacientů s normální a narušenou inhibicí polyklonální tvorby imunoglobulinů

		Pacienti	
		s normální inhibicí	bez inhibice
IL-4	PWM	9,68	9,21
	PWM+ConA	8,12	8,26
	Nestim.	8,94	8,52
	inhibice	9,1 %	3 %
IL-5	PWM	28,79	53,36
	PWM+ConA	19,61	35,18
	Nestim.	69,55	76,32
	inhibice	31,9 %	34,1 %
IL-10	PWM	250,5	167,7
	PWM+ConA	150,0	164,1
	Nestim.	431,4	323,0
	inhibice	40,1 %	2,1 %
TNF-α	PWM	1282,1	657,9
	PWM+ConA	342,9	623,4
	Nestim.	1672,1	1730,7
	inhibice	73,3 %	15,2 %

Závěry:

Na základě produkce imunoglobulinů po stimulaci PWM a PWM+ConA byli pacienti rozděleni na skupinu s normální inhibicí a s narušenou inhibicí polyklonální tvorby imunoglobulinů zejména IgA izotypu. Mezi pacienty s narušenou inhibicí tvorby imunoglobulinů a pacienty s normální inhibicí nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v produkci cytokinů IL-4, IL-5, TNF- α a IL-10 stanovené multiplexovou analýzou. U pacientů s normální inhibicí bylo po stimulaci PWM produkováno více IL-10 a TNF- α než u pacientů s narušenou inhibicí, a zároveň po stimulaci PWM+ConA došlo k výraznému poklesu koncentrace těchto cytokinů.

7.6. Experimentální část č. 6

7.6.1. Vyšetření polymorfismu genů pro apolipoprotein E (*apo ε*) a apolipoprotein B (*apo B*)

Přítomnost genů *apo ε* a *apo B* byla zjišťována metodou hybridizace DNA pomocí diagnostického setu Apolipoprotein E a B (GenID GmbH). Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. č. 18.

Tabulka č. 18 - Detekce alel genů pro apolipoprotein E a apolipoprotein B přítomných u pacientů s časnou parodontitidou

Pacient	Skupina	<i>apo ε</i>	<i>apo B-100</i>	Riziko
1	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
2	A	Heterozygot <i>apo ε</i>2/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz.ch., Hyperlipoproteinémie
5	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
6	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
7	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
8	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
9	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
10	A	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
11	B	Homozygot <i>apo ε</i>2	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Hyperlipoproteinémie
12	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz. ch.
15	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz. ch.
16	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz. ch.
17	B	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
18	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz. ch.
19	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>2	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Hyperlipoproteinémie
20	B	Homozygot <i>apo ε</i> 3	Homozygot <i>apo B</i> Arg	
21	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg / <i>apo B</i> Gln	Alz. ch., Ateroskl., Hypercholesterolnémie
22	B	Heterozygot <i>apo ε</i>3/<i>ε</i>4	Homozygot <i>apo B</i> Arg	Alz. ch.

Alzheimerova choroba - asociace s *apo ε*4, **Hyperlipoproteinémie** - asociace s *apo ε*2

Hypercholesterolnémie – asociace s *apo B-100* Gln, **Ateroskleróza** - asociace s *apo ε*2 a *apo B-100* Gln

U devíti pacientů ze skupiny A (s lehčí formou časné parodontitidy) a pouze u jednoho pacienta ze skupiny B (s těžší formou časné parodontitidy) nebyla zjištěna žádná riziková alela. Alela *apo ε2* byla detekována u tří osob - v heterozygotní formě byla přítomná u jednoho pacienta skupiny A a u jednoho pacienta ze skupiny B, v homozygotní formě byla přítomná u jednoho pacienta ze skupiny B. Alela *apo ε4* byla v heterozygotní formě přítomna u sedmi osob - u jednoho pacienta ze skupiny A, ale u šesti pacientů ze skupiny B. Velmi vzácná a riziková alela *apoB -100 Gln* byla detekována u jedné pacientky ze skupiny B.

Závěry:

U devíti pacientů s horším průběhem onemocnění parodontu (skupina B) byly zjištěny alely *apo ε2* nebo *apo ε4* a nebo *apoB -100 Gln*, které patří mezi rizikové z hlediska metabolismu tuků. Pouze u jednoho pacienta s mírným průběhem onemocnění (skupina A) byly zjištěny rizikové alely *apo ε2* a *apo ε4*.

7.6.2. Biochemická a imunologická vyšetření sér pacientů

V rámci spolupráce s Laboratoří klinické imunologie a alergologie a Biochemickou laboratoří Všeobecné fakultní nemocnice Praha bylo provedeno rutinní biochemické a imunologické vyšetření sér pacientů s časnou parodontitidou. Naměřená data byla logaritmicky transformována a ke statistickým analýzám byly použity hodnoty geometrických průměrů. Signifikace rozdílů mezi skupinami byla zjišťována nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $p=0,05$.

Tabulka č. 19 - Biochemické a imunologické vyšetření sér pacientů s mírným (skupina A) a těžším (skupina B) průběhem onemocnění

	Skupina A				Skupina B			
	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr
		průměr	SE			průměr	SE	
Cholesterol	6	0.728	0.037	* 5.34	9	0.611	0.018	4.08
HDL	6	0.181	0.060	1.51	9	0.144	0.025	1.39
Triglyceridy	6	0.165	0.062	1.46	9	-0.020	0.085	0.96
LDL	6	0.491	0.038	* 3.09	9	0.349	0.039	2.23
Peg	6	1.841	0.043	69.28	9	1.814	0.036	65.19
ACLA IgG	6	0.537	0.047	3.45	9	0.455	0.073	2.85
ACLA IgM	6	0.278	0.077	1.90	9	0.239	0.057	1.73

* signifikantní rozdíl mezi *apo ε2 +* a *apo ε2 -* pacienty hodnocený nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $P = 0.05$

Koncentrace cholesterolu, triglyceridů, LDL, HDL v mmol/l, ACLA v GPL/ml, Peg v j.

Signifikantně vyšší hladiny cholesterolu a LDL byly zjištěny u pacientů s lehčí formou parodontitidy (skupina A) než u pacientů s těžší formou parodontitidy (skupina B) (Tab. č. 19). Průměrné hodnoty koncentrací se však pohybovaly ve fyziologickém rozmezí.

Výsledky biochemických a imunologických vyšetření byly zhodnoceny také ve vztahu k přítomnosti resp. nepřítomnosti rizikových alel pro apolipoprotein E. U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny signifikantně nižší koncentrace cholesterolu, LDL a nižší koncentrace HDL a triglyceridů než u pacientů *apo ε2-* (Tab. č. 20). Hodnoty LDL byly nižší než fyziologické rozmezí. U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny signifikantně vyšší koncentrace cirkulujících imunokomplexů (Peg) než u pacientů *apo ε2-*, které byly také vyšší než fyziologické rozmezí. U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny vyšší hladiny ACLA protilátek IgG a IgM izotypů než u pacientů *apo ε2-*.

Tabulka č. 20 – Biochemické a imunologické vyšetření sér pacientů u pacientů *apo ε2+* a *apo ε2-*

	<i>apo ε2+</i>				<i>apo ε2 -</i>			
	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr
		průměr	SE			průměr	SE	
Cholesterol	3	0.539	0.035	* 3.46	13	0.674	0.023	4.72
Triglyceridy	3	-0.023	0.042	0.95	13	0.060	0.069	1.15
HDL	3	0.141	0.014	1.38	13	0.162	0.032	1.45
LDL	3	0.213	0.065	* 1.63	13	0.432	0.029	2.71
Peg	3	1.962	0.040	* 91.53	13	1.809	0.029	64.49
ACLA IgG	3	0.628	0.195	4.24	13	0.463	0.034	2.90
ACLA IgM	3	0.352	0.071	2.25	13	0.241	0.049	1.74

***** signifikantní rozdíl mezi *apo ε2 +* a *apo ε2 -* pacienty hodnocený nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $P = 0.05$

Koncentrace cholesterolu, triglyceridů, LDL, HDL v mmol/l, ACLA v GPL/ml, Peg v j.

U pacientů *apo ε4+* byly zjištěny nižší koncentrace cholesterolu, HDL, LDL, triglyceridů a cirkulujících imunokomplexů než u pacientů *apo ε4-* (Tab. č. 21). Tyto výsledky jsou však ovlivněny tím, že dva z pacientů *apoε4+* jsou již léčeni s hypertenzí a vysokými hladinami cholesterolu. U obou osob byly výsledky vyšetření v normě. U pacientů *apo ε+* byly zjištěny vyšší hladiny ACLA protilátek IgG a IgM izotypů než u pacientů *apo ε4*.

Tabulka č. 21 – Biochemické a imunologické vyšetření sér pacientů u pacientů *apo ε4+* a *apo ε4-*

	<i>apo ε4+</i>				<i>apo ε4-</i>			
	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr	Počet osob	Logaritmicky transformováno		Geometrický průměr
		průměr	SE			průměr	SE	
Cholesterol	5	0.618	0.013	4.15	11	0.663	0.033	4.60
Triglyceridy	5	0.040	0.139	1.10	11	0.047	0.060	1.11
HDL	5	0.123	0.043	1.33	11	0.173	0.032	1.49
LDL	5	0.369	0.044	2.34	11	0.401	0.046	2.52
Peg	5	1.799	0.052	63.00	11	1.856	0.035	71.70
ACLA IgG	5	0.393	0.049	2.47	11	0.539	0.057	3.46
ACLA IgM	5	0.171	0.079	1.48	11	0.303	0.047	2.01

* signifikantní rozdíl mezi *apo ε4+* a *apo ε4-* pacienty hodnocený nepárovým Studentovým t-testem při hladině významnosti $P = 0.05$

Koncentrace cholesterolu, triglyceridů, LDL, HDL v mmol/l, ACLA v GPL/ml, Peg v j.

Závěry:

Bylo provedeno biochemické a imunologické vyšetření sér pacientů s časnou parodontitidou zaměřené na detekci hladin rizikových markerů pro rozvoj cévních onemocnění. Mezi skupinou pacientů s mírným (skupina A) a horším průběhem parodontitidy (skupina B) byly zjištěny pouze minimální rozdíly a průměrné hodnoty se pohybovaly ve fyziologickém rozpětí daných vyšetření. Signifikantně vyšší hladiny cholesterolu a LDL byly detekovány u pacientů skupiny A.

Zároveň byly výsledky vyšetření zhodnoceny v závislosti na přítomnosti rizikových alel *apo ε2* a *apo ε4*. Dva z pacientů *apo ε4+* jsou již léčeni v souvislosti s hypertenzí a s vysokými hladinami cholesterolu, proto mohou být výsledky touto léčbou ovlivněné. U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny signifikantně nižší koncentrace LDL a cholesterolu a nižší koncentrace HDL a triglyceridů než u pacientů *apo ε2-*. Průměrné hodnoty LDL byly u *apo ε2+* pacientů pod fyziologickou hranicí. U pacientů *apo ε4+* byly detekovány nižší hladiny LDL, HDL, cholesterolu a triglyceridů než u pacientů *apo ε4-*. Výsledky většiny těchto laboratorních vyšetření nenasvědčují možnému rozvoji cévních onemocnění u pacientů s časnou parodontitidou. Dvěma osobám s rizikovým genotypem a zároveň s nízkými hladinami LDL bude doporučeno odborné vyšetření.

8. DISKUSE

Zánětlivá imunitní reakce, kterou organismus reaguje na přítomnost bakterií, umožňuje odstranění infekčního agens, avšak v řadě případů má také negativní účinek na okolní tkáň. Parodontitida je příkladem onemocnění, při kterém působením bakterií dochází k rozvoji akutního a později chronického zánětu, jehož následkem dochází k poškození tkáně. Výsledkem celého procesu je destrukce závěsného aparátu zubů spojená s jejich uvolňováním. Příčinou onemocnění může být porucha tolerance ke komensálním bakteriím, jejichž působením dochází k aktivaci epitelu, který začne prorůstat a vytvářet vhodné prostředí pro růst anaerobních patogenních bakterií (Kawai a spol. 2005). Zároveň tyto bakterie startují zánětlivou imunitní reakci.

První známky parodontitidy se objevují již u mladých osob v období puberty, avšak existuje málo informací o tom, jak se onemocnění v této době rozvíjí, a proč u některých osob dochází k rychlému rozvoji onemocnění a u jiných k progresi nedochází. V této disertační práci se věnuji problematice vzniku a rozvoje parodontitidy u mladých osob. Jeho obsah byl přizpůsoben možnostem pracoviště se snahou využít nejmodernějších metodických postupů.

Počátky studie imunitních mechanismů v patogenezi časně parodontitidy ve Výzkumném ústavu stomatologickém (Všeobecná fakultní nemocnice Praha) spadají do let 1992 – 1993 (Krejsova a spol. 1993), kdy byli pacienti vyhledáváni v rámci systematických stomatologických prohlídek nebo byli doporučeni do VÚS z jiných stomatologických pracovišť. Základním diagnostickým kritériem časně parodontitidy (EOP) byla přítomnost alespoň jednoho parodontálního chobotu hlubokého $\geq 3,5$ mm v oblasti stoliček a nebo řezáků, zánět gingivy a přítomnost *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) v sulkulární oblasti (AAP 1989). Z celkového počtu 9225 vyšetřených osob bylo do studie zahrnuto 48 osob - 19 mužů a 29 žen ve věku 15 – 26 let, bez celkového onemocnění. V rámci následujících studií (Procházková a spol. 1996, Bártová a spol. 1996) bylo vyšetřeno také 47 sourozenců těchto pacientů, z nichž 28 osob mělo zdravý parodont a u 19 osob byla diagnostikována časná parodontitida. Unikátnost celého souboru pacientů spočívá v tom, že vyšetřované osoby byly vybrány při screeningovém vyšetření ještě před tím, než byla časná parodontitida diagnostikována v rámci pravidelné stomatologické prohlídky. Další výhodou souboru je jeho rasová jednotnost.

Zhodnocení progresu onemocnění u pacientů s časnou parodontitidou v průběhu desetileté terapie

V průběhu let 1993 – 2005 jsme pravidelně klinicky a imunologicky sledovali skupinu 20 pacientů s časnou parodontitidou. V prvním roce léčby byli pacienti vyšetřováni a konzervativně léčeni čtyřikrát ročně, všem pacientům byla také aplikována antibiotická léčba. V dalších letech byli pacienti konzervativně ošetřeni dvakrát ročně.

V dlouhodobých studiích byl prokázán pozitivní efekt konzervativní nebo chirurgické léčby a následné pravidelné péče na zlepšení stavu parodontu u pacientů s parodontitidou dospělých (Pihlström a spol. 1983, Lindhle a spol. 1984) nebo časnou parodontitidou (Palmer a spol. 1996, Kamma a spol. 2003). Konzervativní terapie spočívá zejména v mechanickém odstranění zubního plaku a následném poklesu koncentrace patogenních mikroorganismů (Baehni a spol. 1997). Pravidelná konzervativní terapie provedená 4x ročně vedla k signifikantnímu pokles hodnot PD (hloubka chobotů) a indexu CAL u pacientů s parodontitidou dospělých (Cugini a spol. 2000), a také u pacientů s časnou parodontitidou (Kamma a spol. 2003).

Z našich výsledků vyplývá, že pravidelná konzervativní léčba v průběhu deseti let vedla ke zlepšení stavu parodontu u 15 z 20 pacientů s časnou parodontitidou (Krátká a spol. v tisku). Po čtyřech letech léčby jsme rozdělili soubor pacientů na skupinu A - pacienty s mírnou formou onemocnění (10 osob), u nichž přetrvával zánět gingivy, avšak došlo k vymizení parodontálních chobotů, a skupinu B - pacienty s těžší formou onemocnění (10 osob), u nichž byly spolu se zánětem gingivy nadále zjišťovány mělké i hluboké parodontální choboty. K vymizení parodontálních chobotů došlo později u pěti osob ze skupiny B většinou za přispění intenzivní konzervativní terapie nebo použitím chirurgického výkonu. U dvou osob přetrvávaly parodontální choboty déle než deset let. K výrazné progresi onemocnění (hluboké parodontální choboty, extrakce zubů v nejbližší době) došlo u tří osob navzdory konzervativní terapii.

Naše výsledky potvrdily údaje publikované Tanner a spol. (2005), kteří vyšetřili skupinu 225 pacientů s EOP a zjistili, že patologické změny na parodontu u mladých osob při včasné terapii nevedou k rychlému rozvoji onemocnění. Z výsledků studie Kamma a spol. (2004) vyplývá, že k úbytku CAL sice došlo u 20 ze 25 pacientů s EOP, avšak onemocnění bylo aktivní pouze v 1,3 % zubů ošetřených konzervativní terapií.

Mnohem vyšší progresu onemocnění byla zjištěna ve studiích Albandar a spol. (1997) a Gunsolley a spol. (1995). Albandar a spol. (1997) zjistili v šestileté studii 265 pacientů s EOP (s průměrným věkem 22 let), že k progresi onemocnění v daném období došlo u 66 %

pacientů s generalizovanou juvenilní parodontitidou (GJP) a 50 % pacientů s lokalizovanou juvenilní parodontitidou (LJP). Zároveň u 43 % LJP pacientů a 32 % GJP pacientů byly extrahovány zuby v důsledku parodontálního onemocnění (Albandar a spol. 1996). Vysoký počet pacientů s progresivní formou onemocnění může být ovlivněn rasovým složením souboru, neboť v něm převažovali černoši, u nichž byla zjištěna vyšší citlivost k rozvoji parodontitidy. Může být také důsledkem nedostatečné péče a pozdě zahájené léčby. Podobné výsledky publikovali také Gunsolley a spol. (1995), kteří sledovali v dlouhodobé studii 40 pacientů s LJP a 48 pacientů s GJP. Progrese onemocnění u GJP pacientů byla rychlejší než u pacientů s LJP, neboť při ní dochází k horizontální resorpci alveolární kosti a onemocnění postihuje vyšší počet zubů. LJP pacienti, kteří byli pravidelně ošetřováni měli nižší CAL a méně extrahovaných zubů než LJP pacienti, kteří nebyli ošetřováni. Naopak u GJP ošetřovaných i neošetřovaných pacientů byly detekovány vysoké hodnoty CAL a vysoký počet extrahovaných zubů.

Domníváme se, že pokud je onemocnění včas zachyceno a následuje-li pravidelná konzervativní terapie, pak u většiny mladých pacientů dochází k regeneraci tkáně. Zvláště citlivým osobám, které nereagují na konzervativní léčbu zlepšením stavu parodontu je třeba věnovat mnohem vyšší péči, případně zvolit chirurgickou léčbu, aby nedošlo k tak rychlému nástupu onemocnění jako ve studii Albandar a spol. (1996) nebo Gunsolley a spol. (1995).

Vliv IL-1 kombinovaného genotypu na progresi onemocnění

Primární citlivost k rozvoji onemocnění parodontu je dána genotypem každého jedince (Michalowicz 1994). Navzdory intenzivnímu výzkumu nejsou dosud odhaleny geny podílející se na vzniku parodontitidy. Ačkoliv bylo studováno velké množství genů, které by mohly mít význam v patogenezi onemocnění parodontu, za pravděpodobně rizikový byl označen zatím pouze tzv. IL-1 kombinovaný genotyp (Loos a spol. 2005). Kornman a spol. (1997) zjistili asociaci mezi parodontitidou a polymorfismem v genech kódujících IL-1A (záměna nukleotidů C → T v pozici -889) a IL-1B (záměna nukleotidů C → T v pozici +3953). Přítomnost těchto dvou rizikových alel, tzv. IL-1 kombinovaný genotyp, byla signifikantně vyšší u pacientů s parodontitidou dospělých a pacientů s časnou parodontitidou než u zdravých osob (Kornman et al. 1997, Parkhill a spol. 2000; Lang a spol. 2000, Meisel a spol. 2003). Přítomnost IL-1 kombinovaného genotypu jsme potvrdili také v naší studii u 60 % pacientů s časnou parodontitidou (Krátká a spol. zasláno do tisku). Význam IL-1 kombinovaného genotypu však byl zpochybněn zejména ve studiích provedených na thaiské, čilské či japonské populaci (Anusaksathien a spol. 2003, Quappe a spol. 2004, Gonzáles a

spol. 2003), ale také v některých studiích provedených na bělošské populaci (Firatli a spol. 1996).

IL-1 kombinovaný genotyp ovlivňuje průběh onemocnění. McGuire a Nunn (1999) zjistili v longitudinální studii, že u pacientů s IL-1 kombinovaným genotypem je 2,7 krát vyšší riziko ztráty zubů než u pacientů bez něj. U kuřáků s IL-1 kombinovaným genotypem je dokonce 7,7 krát vyšší riziko ztráty zubů. V naší studii jsme vyšší výskyt rizikových alel detekovali u pacientů skupiny B (s horším průběhem onemocnění), než u pacientů skupiny A (s lehčí formou onemocnění). Rizikové alely nebyly zjištěny u čtyř pacientů skupiny A, ale pouze u jednoho pacienta skupiny B. Z našich výsledků tedy také vyplývá možnost vazby mezi IL-1 rizikovým genotypem a horším průběhem onemocnění.

Přítomnost rizikové alely HLA-DR4 jsme detekovali pouze u jedné pacientky s EOP. Signifikantně vyšší frekvenci této alely zjistil Firatli a spol. (1996) u pacientů s juvenilní a rychle progredující parodontitidou než u zdravých osob. Genetická predispozice k rozvoji onemocnění se uplatňuje za přítomnosti dalších rizikových faktorů jako např. přítomnosti patogenních bakterií či kouření (Cullinan a spol. 2001).

Přítomnost patogenních bakterií v gingiválním sulku resp. parodontálním chobotu u pacientů s mírnou a progresivní formou onemocnění

Časná parodontitida je asociovaná s řadou patogenních bakterií, většinou striktně anaerobních. U pacientů s časnou parodontitidou byly detekovány *A. a.*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* a *T. denticola* (Haffajee a Socransky 1994, Albandar a spol. 1997, Kamma a spol. 2004). Přítomnost bakterií *A. a.* klesá u pacientů se stoupajícím věkem, naopak přítomnost *P. gingivalis* stoupá u pacientů se stoupajícím věkem (Rodenburg a spol. 1990). U osob se zdravým parodontem mladších 19 let se vyskytuje *A. a.* jen zřídka, u osob se zdravým parodontem se vyskytuje u 33 % osob ve věku 19 – 35 let (Slots a Ting 1999). Naopak *P. gingivalis* se nevyskytuje u osob se zdravým parodontem ve věku do 35 let (Slots a Ting 1999).

V gingiválním sulku resp. parodontálním chobotu pacientů s časnou parodontitidou jsme detekovali *T. denticola* (u 81,3 % pacientů), *P. gingivalis* (u 62,5 %), *A. a.* (u 50 %), *P. intermedia* (u 43,8 %) a *T. forsythia* (31,3 %) (Krátká a spol. v tisku). U pacientů s mírnou formou onemocnění převládaly *T. denticola* a *A. a.*, naopak u pacientů s těžší formou onemocnění převažovaly *T. denticola* a *P. gingivalis*. Žádná z patogenních bakterií nebyla zachycena pouze u jednoho pacienta. Z výsledků vyplývá, že ačkoliv je stav parodontu

stabilizovaný, přítomnost rizikových bakterií může znovu stimulovat rozvoj zánětlivé reakce, a proto je nutná stálá péče o parodont a pravidelná konzervativní terapie.

Socransky a spol. (2000) zjistili u pacientů s IL-1 kombinovaným genotypem vyšší počet druhů patogenních bakterií a vyšší koncentraci patogenních bakterií v hlubokých parodontálních chobotech, než u pacientů bez rizikového genotypu. V naší studii jsme u pacientů bez IL-1 kombinovaného genotypu detekovali maximálně dva druhy patogenních bakterií, avšak u pacientů s IL-1 kombinovaným genotypem jsme zjistili až pět druhů bakterií (Krátká a spol. v tisku).

Detekce poruchy funkce neutrofilních granulocytů u pacientů s časnou parodontitidou

Vznik a vývoj zánětlivé reakce je v prvních fázích onemocnění ovlivněn zejména funkcí neutrofilních granulocytů. U pacientů s juvenilní parodontitidou byly detekovány poruchy funkce neutrofilních granulocytů (Suzuki a spol. 1984, Van Dyke a spol. 1987, Zucchelli a spol. 1991). Byly popsány jak defekty v chemotaxi, tak v tvorbě kyslíkových radikálů (Van Dyke a spol. 1985, Daniel a spol. 1993, Biasi a spol. 1999). V průběhu naší studie jsme u pacientů nezjistili poruchy chemotaxe, avšak opakovaně jsme potvrdili sníženou tvorbu kyslíkových radikálů neutrofilními granulocyty stimulovanými zymosanem, který byl opsonizován sérem pacientů (Procházková a spol. 1995). Nižší hodnoty indexu metabolického vzplanutí než je jeho fyziologické rozmezí byly zjištěny na počátku léčby u 90 % pacientů. Po pěti letech léčby došlo u 67 % pacientů ke zvýšení jejich hodnot, přesto u 53 % pacientů přetrvávala defektní funkce neutrofilních granulocytů.

Tvorba cytokinů po *in vitro* stimulaci mononukleárních buněk pacientů a zdravých sourozenců působením *E. coli* a *A. a.*

Počáteční nespecifická imunitní reakce postupně přechází ve specifickou imunitní reakci. Ve stabilních lézích v parodontu převládají T lymfocyty, naopak v aktivních lézích dochází k nahromadění B lymfocytů (Gemmell a Seymour 1991, Del Prete a spol. 1991, Yamazaki a spol. 1993, Yamazaki a spol. 2000). Buňky specificky reagující s patogenními bakteriemi se vyskytují také v periferní krvi. Ivanyi a Lehner (1970) zjistili, že mononukleární buňky izolované z periferní krve pacientů s parodontitidou prolifерují po stimulaci bakteriemi zubního plaku signifikantně více než buňky zdravých osob. Jejich studie poukázala na význam buněčné imunity představované T lymfocyty. Imunitní reakce je regulována T lymfocyty zejména prostřednictvím produkce cytokinů, případně buněčným kontaktem.

Jelikož produkce cytokinů je ovlivněna genetickou predispozicí osob, sledovali jsme v další části studie rozdíly v tvorbě cytokinů mezi pacienty a jejich zdravými sourozenci se zdravým parodontem, ale s přítomností *A. a.* v sulkulární oblasti. V době studie byli pacienti léčeni již druhým rokem. Mononukleární buňky izolované z periferní krve pacientů a jejich zdravých sourozenců byly stimulovány mitogeny a bakteriemi (Bártová a spol. 2000). Signifikantně vyšší hladiny IL-4 a signifikantně nižší hladiny IFN- γ byly detekovány po 24 hodinové stimulaci *E. coli* a *A. a.* u pacientů než u jejich sourozenců. V produkci IL-10 nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly. Žádné statisticky průkazné rozdíly nebyly zjištěny v produkci IL-4, IL-10 a IFN- γ mezi skupinami po 72 hodinách stimulace. U pacientů byla detekována vyšší pohotovost k tvorbě IL-4 než u zdravých sourozenců. Zároveň byla zjištěna signifikantně vyšší tvorba IgM po stimulaci *E. coli* u pacientů než u zdravých sourozenců. Yamazaki a spol. (1994) a Aoyagi a spol. (2000) prokázali také zvýšenou tvorbu Th2 cytokinů po *in vitro* stimulaci mononukleárních buněk pacientů s parodontitidou než u zdravých osob.

Využití metody ELISPOT k analýze imunitní reakce po stimulaci vlastním a standardním kmenem *A. a.* a standardním kmenem *E. coli*

Vývoj imunitní reakce závisí i na počtu buněk, které jsou aktivovány v průběhu reakce k tvorbě cytokinů a zároveň na koncentraci uvolňovaných cytokinů. Metoda ELISPOT (Enzyme linked immunosorbent spot) umožňuje detekovat buňky aktivně produkující daný cytokin, které jsou z důvodů jejich malého počtu špatně zachytitelné jinými metodami. Citlivost metody je uváděna mezi $1/10^6$ – $1/3.10^6$ buněk (Asai a spol. 2000, Helms a spol. 2000). Zároveň umožňuje rozlišit buňky produkující velké a malé množství cytokinů. K hodnocení metody byl vypracován v rámci ^{naší} studie počítačový program využívající software LUCIA.

Metoda ELISPOT modifikovaná pro detekci cytokinů je používána k monitorování imunitní reakce v průběhu léčby (Misumi a spol. 2003, Schotte a spol. 2004), k posouzení výsledků vakcinace (Asai a spol. 2000, Smith a spol. 2001), k detekci autoreaktivních klonů T lymfocytů u pacientů s autoimunitními chorobami, např. u myasthenia gravis (Link a spol. 1992, Mc Cutcheon a spol. 1997), sclerosis multiplex (Söderström a spol. 1994) nebo rheumatoidní artritidy (Berg a spol. 2001). Nebyla však zatím použita k monitorování produkce cytokinů u pacientů s parodontitidou.

V naší studii jsme sledovali počet mononukleárních buněk produkujících IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ po stimulaci standardním nepatogenním kmenem *E. coli*, standardním kmenem

A. a. a kmenem *A. a.* izolovaným z gingiválního sulku resp. parodontálního chobotu (tzv. vlastní kmen *A. a.*) pacientů či zdravých kontrolních osob.

V nestimulovaných kulturách mononukleárních buněk pacientů i kontrolních osob byla detekován velký počet buněk spontánně produkujících cytokiny. U pacientů bylo zjištěno velké množství buněk produkujících IL-6 a IL-10, kdežto u zdravých osob bylo prokázáno více buněk produkujících IL-6 a IFN-gama. Avšak rozdíly mezi skupinami nebyly signifikantní. Podobné výsledky zjistili Hagiwara a spol. (1995), kteří detekovali v periferní krvi zdravých osob vysoký počet buněk produkujících spontánně IL-6 a IL-10 a nízký počet buněk tvořících spontánně IL-4 a IFN-gama. Hlavním zdrojem IL-6 a IL-10 byly v jejich studii CD14+ buňky, tj. monocyty a makrofágy, hlavním zdrojem IL-4 byly Th buňky a IFN- γ byl tvořen různými typy buněk, převážně Tc buňkami. V další studii bylo metodou ELISPOT zjištěno signifikantně více buněk spontánně tvořících IL-6 a IL-10 v periferní krvi pacientů s lupus erythematosus než u zdravých kontrol (Hagiwara a spol. 1996)^A. Také Kanik a spol. (1998) detekovali v periferní krvi pacientů s chronickou rheumatoidní artritidou zvýšený počet buněk spontánně produkujících IL-6, IL-10 a TNF- α než u zdravých osob. Naopak signifikantně nižší počet buněk spontánně tvořících IL-2, IL-4, IL-10 a IFN- γ byl zjištěn u pacientů HIV+ než u zdravých osob (Hagiwara a spol. 1996)^B.

Spoty se výrazně lišily svojí velikostí. V naší studii bylo 85 – 95 % malých spotů (velikost $1,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), 5 – 12 % středně velkých spotů (velikost $2,1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) a 1 – 3 % velkých spotů (velikost $6,2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) v závislosti na typu použité stimulace. Po stimulaci standardním kmenem *A. a.* jsme detekovali střední a velké IFN- γ + a IL-6+ spoty u pacientů než u zdravých osob, zatímco po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* jsme zjistili více velkých spotů u zdravých osob než u pacientů. Po stimulaci oběma kmeny *A. a.* byly detekovány střední a velké spoty IL-10+ častěji u zdravých osob než u pacientů. Asai a spol. (2000) potvrdili ve své studii, že velké spoty jsou mnohonásobně vyššími producenty IFN- γ než spoty malé, a tudíž mnohem intenzivněji ovlivňují imunitní odpověď. Guerkov a spol. (2003) zjistili, že velké spoty tvoří T lymfocyty (o velikosti $8 \times 10^4 \mu\text{m}^2$), střední spoty tvoří monocyty a nejmenší spoty tvoří B lymfocyty. V naší studii jsme nezjišťovali, která populace buněk tvoří dané cytokiny.

A. a. má inhibiční účinky na imunitní reakci. Inhibici proliferace mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve (PBMC) pacientů a chronickou parodontitidou po stimulaci *A. a.* a *P. gingivalis* zjistili také Getka a spol. (1996). Inhibice produkce cytokinů T lymfocyty izolovanými z periferní krve po stimulaci *A. a.* byla zjištěna také u pacientů

s chronickou parodontitidou (Zadeh a spol. 2000). Autoři zjistili, že po stimulaci *A. a.* došlo k aktivaci pouze 2 % T lymfocytů. Expres aktivčního znaku CD69 na T lymfocytech byla zjišťována po stimulaci s *A. a.* a poté PMA-ionomycinem. 90 % T lymfocytů neexprimovalo aktivční znak CD69 a bylo tudíž ve stavu klonální anergie navozeném stimulací *A. a.* Jednou z možností, jak *A. a.* inhibuje imunitní reakci je produkce leukotoxinu LtxA, který se váže na lymfoidní a myeloidní buňky prostřednictvím vazby s LFA-1 (Lally a spol. 1997). Ve vysoké koncentraci způsobuje lýzu či apoptózu neutrofilů, monocytů a T buněk (Mangan a spol. 1991, Taichman a spol. 1991). CDT (cytolethal toxin) naopak způsobuje zastavení buněčného cyklu v G2 fázi, a tím blokuje proliferaci buněk (Akifuza a spol. 2001).

Z našich výsledků vyplývá, že k aktivaci buněk po stimulaci *A. a.* dochází, avšak záleží na délce stimulace. Proto jsme se zaměřili také na sledování kinetiky reakce. Počet buněk tvořících cytokiny jsme sledovali vždy třetí, pátý a sedmý den stimulace. K útlumu imunitní reakce sice docházelo, nicméně ve většině případů byl alespoň jeden den detekován vyšší počet spotů ve stimulované kultuře než v nestimulované. K signifikantnímu poklesu počtu IL-10+ buněk došlo pouze po stimulaci *E. coli* u pacientů.

U zdravých osob byla kinetika reakce takřka nezávislá na použité bakteriální stimulaci. Stimulace bakteriemi aktivovala u zdravých osob třetí den buňky tvořící IL-6 a IFN- γ , pátý den buňky tvořící IL-4 a sedmý den buňky tvořící IL-10. U pacientů s časnou parodontitidou byla kinetika reakce po stimulaci *E. coli* a vlastním kmenem *A. a.* podobná reakci zjištěné u zdravých kontrol. Naopak po stimulaci standardním kmenem *A. a.* byl u pacientů aktivován nižší počet buněk a aktivace imunitní reakce byla pomalejší než po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* Signifikantně nižší počet buněk produkující IL-4 a IL-6 byl pátý den zjištěn u pacientů po stimulaci standardním kmenem *A. a.* než po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* Působením standardního kmenu *A. a.* došlo též pátý a sedmý den stimulace k výrazné inhibici počtu IL-10 + spotů. Z těchto výsledků vyplývá, že standardní patogenní kmen *A. a.*, který se pravděpodobně nevyskytoval v organismu pacientů, na rozdíl od kmenů *A. a.* přítomných v sulkulární oblasti pacientů tlumí aktivitu buněk tvořících IL-4, IL-10 a IL-6. Po střetu imunitního systému s cizím *A. a.* dochází v prvních dnech k výraznému utlumení aktivity mononukleárních buněk. Fujihashi a spol. (1996) zjistili, že v gingivální tkáni pacientů s AP se vyskytují klony T lymfocytů exprimujících mRNA pro IL-6, IL-10 a IL-13. Autoři nezjistili expresi mRNA pro IL-4 u T lymfocytů izolovaných z tkáně na rozdíl od T lymfocytů izolovaných z periferní krve. Podobné spektrum cytokinů bylo produkováno také v naší studii, a tudíž tyto subpopulace T lymfocytů mohly být inhibovány působením standardního kmenu *A. a.* i v našem experimentu.

V supernatantech odebíraných po kultivaci buněk na metodu ELISPOT jsme zároveň zjišťovali koncentraci cytokinů metodou ELISA. Z těchto výsledků vyplývá, že ačkoliv byl působením bakterií aktivován podobný počet buněk u pacientů a zdravých osob, produkce cytokinů byla u pacientů mnohem nižší než u zdravých osob. Maximální produkce cytokinů byla většinou detekována ve stejných dnech, kdy byl zjištěn maximální počet buněk tvořících daný cytokin nebo v následujícím dni. Signifikantně vyšší koncentrace IL-6 a IFN- γ po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* a vyšší produkce IL-6 po stimulaci standardním kmenem *A. a.* a *E. coli* byly detekovány u zdravých kontrol než u pacientů. Signifikantně vyšší koncentrace IFN- γ byla pátý den zjištěna po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* u zdravých osob než u pacientů. Také koncentrace IL-4 a IL-10 byly vyšší u zdravých osob než u pacientů.

Značná heterogenita v metodických přístupech, heterogenita používaného materiálu (buňky izolované z tkáně, buňky izolované z periferní krve, T-buněčné linie a klony) a stimulace různými druhy patogenních bakterií či jejich komponent způsobuje problémy v interpretaci získaných výsledků (Gemmell a Seymour 2004).

Význam cytokinů v patogenezi parodontitidy byla sledována zejména v tkáni parodontu. Bohužel u pacientů s mírným poškozením parodontu, kteří byli zastoupení v naší studii, není z etických důvodů možné odebrat vzorky tkáně. Berglundh a spol. (2002) zjistili v aktivních lézích u pacientů s chronickou parodontitidou přítomnost CD4⁺ buněk produkujících IL-2, IL-4, IL-6 a IFN- γ . V tkáni pacientů s gingivitidou byla detekována exprese mRNA pro IL-2, IFN- γ , IL-10 a IL-5, naopak u pacientů s parodontitidou byla detekována mRNA pro IL-2, IFN- γ (Suarez a spol. 2004). V jiné studii byla v homogenátu tkáně pacientů s parodontitidou detekována signifikantně vyšší koncentrace IL-1 β , TNF- α , IL-2 a IFN- γ a naopak vyšší koncentrace IL-4 a IL-10 byly zjištěny ve vzorcích tkáně zdravých osob (Gorska a spol. 2003). Z těchto studií vyplývá, že cytokin IL-10 má patrně ochranný význam ve zdravých tkáních. Jeho vyšší koncentrace byla zjištěna také v sulkulární tekutině odebrané ze zdravých lokalit než v sulkulární tekutině odebrané z aktivní léze u pacientů s chronickou parodontitidou (Goutoudi a spol. 2004). Suprese buněk tvořících IL-10, kterou jsme zjistili u pacientů po *in vitro* kultivaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve po stimulaci s *A. a.* může tedy být příčinou rozvoje zánětu, pokud dojde v gingiválním chobotu k namnožení tohoto patogenního kmenu *A. a.*. V současné době převažuje názor, že subpopulace Th1, Th2 a Th3 hrají roli v regulaci onemocnění. Pokud je narušena jejich rovnováha, dochází k rozvoji onemocnění.

Tvorba imunoglobulinů po stimulaci vlastním a standardním kmenem *A. a.* a standardním kmenem *E. coli*

Koncentrace imunoglobulinů byla detekována v supernatantech odebíraných sedmý den kultivace. Po stimulaci *E. coli* byla zjištěna signifikantně vyšší produkce IgM u zdravých osob než pacientů. Po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* byla naměřena u zdravých osob vyšší produkce IgA, avšak nižší produkce IgM a IgG než u pacientů.

Signifikantně vyšší tvorba IgM protilátek po stimulaci *E. coli*, ale také *A. a.* u zdravých osobě než u pacientů byla detekována několikrát v průběhu desetileté terapie pacientů s časnou parodontitidou. Opačné výsledky zjistila Bártová a spol. (1992) u pacientů s rozvinutou parodontitidou dospělých. U těchto osob byly po stimulaci *E. coli* a *A. a.* naměřeny signifikantně vyšší hladiny IgA a IgG než u zdravých osob. Domníváme se, že u pacientů s rozvinutou parodontitidou docházelo k výrazné polyklonální aktivaci tvorby imunoglobulinů, naopak u pacientů s časnou parodontitidou ^{byla} tlumena polyklonální aktivace tvorby imunoglobulinů. Vysoké hladiny IgA mohou mít ochranný charakter, neboť jejich zvýšená koncentrace korelovala se zlepšením stavu parodontu a její vyšší koncentrace byla signifikantně vyšší v sulkulární tekutině odebrané ze zdravých lokalit než z postižených lokalit (Bártová a spol. 1989). Ebersole a spol. (1994) detekovali vyšší koncentraci IgA protilátek specifických vůči *A. a.* u pacientů, u kterých došlo po léčbě k zlepšení stavu parodontu, naopak u pacientů s aktivním onemocněním se vyskytovala vyšší produkce IgG protilátek specifických vůči *A. a.*

Inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů u pacientů s časnou parodontitidou

Polyklonální aktivace, ke které dochází působením bakterií, může vést ke vzniku autoproti látek. V místě zánětu je proto nezbytné, aby došlo k utlumení této polyklonální aktivace. Jedním z přístupů, které byly používány ke sledování polyklonální tvorby protilátek v osmdesátých letech minulého století a regulace jejich tvorby byla *in vitro* kultivace mononukleárních buněk s pokeweed mitogenem (PWM) a s pokeweed mitogenem a concanavalinem A (PWM + ConA). Pokeweed mitogen (PWM) je látka izolovaná z *Phytolacca americana*, která polyklonálně stimuluje T a B lymfocyty. Concanavalin A (ConA), je látka izolovaná z *Canavalia ensiformis*, která aktivuje T buňky. Po současné stimulaci buněk PWM a ConA dochází k útlumu tvorby imunoglobulinů v důsledku aktivace T lymfocytů s tlumivým účinkem (Miyawaki a spol. 1981, Jeneway 1988). Bártová a spol. (1989) prokázali, že po současném použití PWM a ConA (PWM+ConA) dochází k poklesu

polyklonální tvorby imunoglobulinů u zdravých osob, ale nikoliv u pacientů s rozvinutou parodontitidou v terminálním stádiu.

Signifikantní inhibice tvorby IgA a IgG u zdravých osob po stimulaci PWM+ConA v porovnání s PWM stimulací byla potvrzena také v další části disertační práce. Naopak na počátku léčby pacientů s časnou parodontitidou byly zjištěny signifikantně vyšší hladiny IgA a IgM po stimulaci PWM+ConA než po stimulaci PWM. Po zahájení konzervativní terapie došlo naopak k inhibici produkce imunoglobulinů po PWM+ConA než po PWM stimulaci. Signifikantní inhibice tvorby IgA a IgM byla zjištěna v prvním, čtvrtém a desátém roce léčby pacientů.

Nepodařilo se nám však prokázat vztah mezi narušenou inhibicí tvorby imunoglobulinů a progresí onemocnění. Inhibice imunoglobulinů u jednotlivých pacientů se měnila v průběhu let nezávisle na jejich klinickém stavu. U pacientů s lehčí formou onemocnění byla zjištěna častější inhibice tvorby IgG a IgM, naopak u pacientů s těžší formou onemocnění byla zjištěna častější inhibice tvorby IgA. To může opět potvrzovat význam ^{IgA} v ochraně parodontu.

V průběhu sledovaného 10tiletého období došlo k signifikantnímu zvyšování produkce IgA po stimulaci PWM. Zjištěný signifikantní nárůst tvorby IgA u pacientů souvisel se zlepšením jejich klinického stavu parodontu.

Inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů u pacientů s imunodeficitním onemocněním, vliv infúze intravenózních imunoglobulinů na *in vitro* imunitní reakci

V další části studie jsme aplikovali naše zkušenosti s vyšetřováním tvorby imunoglobulinů po polyklonální aktivaci i se sledováním inhibice jejich tvorby na detekci tvorby imunoglobulinů u pacientů s imunodeficitním onemocněním (Krátka a spol. 2002). Pacienti se selektivním IgG deficitem (IgGSD) měli velmi nízké hladiny IgG v séru, pacienti s běžným variabilním imunodeficitem (CVID) měli velmi nízké hladiny IgG a dalších imunoglobulinů v séru. Pacienti byli léčeni infúzí intravenózních imunoglobulinů (IVIG). Aplikace intravenózních imunoglobulinů má imunoregulační účinek, který ovlivňuje produkci cytokinů, proliferaci T lymfocytů a ovlivňuje interakci mezi T a B lymfocyty (Mouthon a spol. 1996, Andersson a spol. 1996, Sewell a spol. 1999). Imunoregulační efekt IVIG přetrvával *in vitro* ještě týden po jeho aplikaci (Krátka a spol. 2002).

U pacientů s IgG deficitem byla před podáním infúze zjištěna signifikantně vyšší polyklonální tvorba IgA a IgM než u zdravých kontrol. Působením infúze došlo k poklesu této polyklonální tvorby. Zároveň jsme zjistili signifikantně vyšší koncentraci IgG u pacientů po aplikaci IVIG než u zdravých osob (Krátka a spol. 2002). Inhibice produkce IgM po aplikaci

IVIG byla také popsána Kondo a spol. (1991), kteří zjistili, že pokles byl způsoben navázáním imunoglobulinů přítomných v IVIG na Fc receptory antigen-prezentujících buněk a B lymfocytů.

U pacientů s imunodeficity byla zjišťována inhibice tvorby polyklonálních imunoglobulinů po stimulaci PWM+ConA. Signifikantní inhibice tvorby IgA, IgG a IgM byla zjištěna u zdravých osob a také byla zjištěna signifikantní inhibice IgM u CVID pacientů před infúzí. U většiny pacientů s IgG imunodeficitem vedla IVIG infúze k poklesu tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA stimulaci, naopak u většiny CVID pacientů došlo po infúzi ke zvýšení tvorby imunoglobulinů po PWM+ConA stimulaci.

Působením infúze IVIG dochází tedy k ovlivnění imunitní reakce u pacientů s imunodeficitním onemocněním, která vede buď k aktivaci nebo k inhibici imunitní reakce. U pacientů s CVID naopak dochází ke zvýšení tvorby imunoglobulinů. Bohužel jsme neměli možnost sledovat produkci cytokinů a zjistit tak, který faktor aktivoval lymfocyty k tvorbě imunoglobulinů *in vitro*, což by mělo význam pro terapii i bližší charakterizaci onemocnění.

Tvorba cytokinů po polyklonální stimulaci mononukleárních buněk

V další části studie jsme se věnovali objasnění faktorů, které mohou ovlivňovat inhibici tvorby imunoglobulinů. Přesnější přehled o spektru cytokinů produkovaných po PWM a PWM+ConA jsme získali po použití metody RayBio®. Tato moderní screeningová metoda umožňuje detekovat až 40 cytokinů najednou v jednom vzorku s citlivostí 100 až 1000 krát vyšší než v metodě ELISA. V předběžné studii jsme zjistili přítomnost 37 cytokinů v supernatantech získaných pátý den stimulace buněk u tří osob s normální inhibicí polyklonální tvorby imunoglobulinů (tj. inhibice >75 %) a tří osob bez inhibice polyklonální tvorby IgG a IgA. Žádná z vyšetřovaných osob neměla v době experimentu akutní zánět v parodontu.

Zjistili jsme, že po stimulaci PWM se tvoří více IL-1 α , IL-7, IL-15, IL-17, s TNF-RI a IL-6sR než po stimulaci PWM+ConA. Naopak po stimulaci PWM+ConA bylo detekováno více IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TGF- β a TNF- β než po stimulaci PWM. Po PWM stimulaci byla detekována vyšší tvorba cytokinů IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-12 p70, TNF- α a IFN- γ než po PWM+ConA stimulaci u pacientů s inhibicí, avšak nižší tvorba po PWM než po PWM+ConA u pacientů bez inhibice.

Metodou multiplexové analýzy jsme v další části studie změřili koncentrace některých vytipovaných cytokinů v supernatantech získaných pátý den stimulace od osmi pacientů s EOP s normální inhibicí tvorby imunoglobulinů a čtyř pacientů s EOP se sníženou inhibicí

tvorby imunoglobulinů. Mezi pacienty s narušenou inhibicí tvorby imunoglobulinů a pacienty s normální inhibicí nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v produkci cytokinů IL-4, IL-5, TNF- α a IL-10. Zjistili jsme však, že u pacientů s normální inhibicí bylo po stimulaci PWM produkováno více IL-10 a TNF- α než u pacientů s narušenou inhibicí, a zároveň po stimulaci PWM+ConA došlo k výraznému poklesu produkce těchto cytokinů. Tyto výsledky jsou zatím předběžné a jsou součástí současného vědeckého projektu.

Inhibice tvorby imunoglobulinů po PWM a PWM+ConA se v jiných laboratořích sledující onemocnění parodontu v současné době nepoužívá. Pouze Fujihashi a spol. (1996) zjistili po ConA stimulaci PBMC pacientů s parodontitidou dospělých expresi mRNA pro IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 a IFN- γ . Zároveň izolovali z tkáně CD4+ buňky exprimující dva rozdílné profily cytokinů – v prvním profilu detekovali IL-6, IL-10 a IL-13, ve druhém zjistili přítomnost IFN- γ , IL-6 a IL-13. Každý cytokin pravděpodobně výrazně ovlivňuje inhibici tvorby imunoglobulinů *in vitro*. Přesto přesné závěry budeme moci udělat až po došetření koncentrací dalších cytokinů ve vzorcích..

V předchozí studii (Bártová a spol. 1998) byla sledována změna exprese povrchových molekul na mononukleárních buňkách po stimulaci PWM a PWM+ConA u pacientů s časnou parodontitidou. Při PWM+ConA stimulaci byla nejvíce ovlivněna populace B lymfocytů a CD4+ T lymfocytů. Nebyly zjištěny změny v expresi CD8+ molekul, a tudíž nebyla potvrzena účast Tc lymfocytů v inhibici polyklonální tvorby imunoglobulinů. Současně byla zjištěna signifikantně nižší exprese adhesivních molekul CD43 a CD44 po PWM+ConA stimulaci než po PWM stimulaci. Působením ConA tedy došlo k útlumu aktivace Th a B lymfocytů a zároveň k ovlivnění některých akcesorních molekul, které se podílejí na aktivaci a přenosu buněčných signálů.

Vztah mezi parodontitidou a aterosklerózou – vyšetření genetické predispozice k rozvoji cévních onemocnění a výsledky biochemického vyšetření u pacientů s časnou parodontitidou

Parodontitida ovlivňuje vznik a průběh kardiovaskulárních onemocnění. Z dlouhodobých studií vyplývá, že u pacientů s parodontitidou je 20 – 25 % riziko vzniku infarktu myokardu (De Stefano 1993, Janket a spol. 2003) a 17 % riziko vzniku mozkové příhody (Morrison a spol. 1999). Bakterie *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* i *A. a.* se podílejí na tvorbě aterosklerotických plátů (Haraszthy a spol. 2000, Taylor – Robinson a spol. 2002, Fiehn a spol. 2005, Ford a spol. 2005). Zvýšené titry protilátek proti parodontálním patogenům se vyskytují v sérech pacientů s aterosklerózou

(Chiu a spol. 1999, Pussinen a spol. 2005). Otázkou ovšem zůstává, zda je parodontitida příčinou či následkem rozvoje aterosklerózy (Haynes a Stanford 2003). Proto jsme v další části studie zjišťovali, zda u pacientů s EOP, jejichž věk se v současnosti pohybuje mezi 25-38 lety, již dochází k rozvoji aterosklerózy. Dva pacienti jsou již léčeni v souvislosti se zvýšeným krevním tlakem a vyššími hladinami cholesterolu.

V akreditované laboratoři byla vyšetřena séra pacientů. Byly měřeny hladiny cholesterolu, LDL, HDL, triglyceridů a cirkulujících imunokomplexů. Mezi skupinou pacientů s lepším (skupina A) a horším průběhem parodontitidy (skupina B) byly zjištěny pouze minimální rozdíly a průměrné hodnoty se pohybovaly ve fyziologickém rozpětí. Signifikantně vyšší hladiny cholesterolu a LDL byly však detekovány u pacientů s mírným průběhem onemocnění.

U pacientů s časnou parodontitidou jsme zjišťovali přítomnost genů pro Apolipoprotein E a B. Apo E je sérový protein, který je zahrnutý v transportu, uchování a metabolismu cholesterolu. Nejčastějšími alelami *apo ε* genu jsou $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, které kódují proteinové izoformy Apo E2, Apo E3 a Apo E4 (Eichner a spol. 2002). U pacientů *apo ε 2+* dochází k rozvoji hyperlipidémie III charakterizované vysokou koncentrací triglyceridů, cholesterolu a VLDL a současně sníženou koncentrací LDL v plazmě (Brunzell a Failor 2005). 94,4 % pacientů s hyperlipidémií je homozygotních v *apo ε 2*, avšak pouze u 2 % pacientů homozygotních v tomto znaku dochází k rozvoji hyperlipoproteinémie III (Civeira a spol. 1996).

Přítomnost apolipoproteinu Apo E4 zvyšuje rychlost v metabolismu tuků, a tím dochází ke zvýšené koncentraci cholesterolu a triglyceridů v séru osob *apo ε 4+* (Stengard a spol. 1995). U pacientů s koronárním onemocněním byla zjištěna signifikantně vyšší frekvence homozygotních i heterozygotních *apo ε 4* alel (Wang a spol. 2006). Zvýšená frekvence *apo ε 4* (65 %) alely byla však zjištěna zejména u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Mayeux a spol. 1998). Homozygotní kombinace *apo ε 4* se vyskytuje u 12 – 15 % pacientů s Alzheimerovou chorobou a pouze u 1-3 % zdravých kontrolních osob (Blacker a Tanzi, 1998). Přítomnost homozygotní *apo ε 4* alely zvyšuje pravděpodobnost vzniku Alzheimerovy choroby (30 % populace ve věku 65 let), naopak absence rizikové alely snižuje pravděpodobnost vzniku Alzheimerovy choroby (9 % populace ve věku 65 let) (Seshadri a spol. 1995).

Apo B-100 je součástí LDL a prostřednictvím něj se tyto částice váží na receptor pro LDL. Apolipoprotein B-100 se vyskytuje ve třech formách *Arg3500Gln*, *Arg 3531Cys* a *Arg 3500Trp*. Mutace *apo B-100 Arg3500Gln* má nižší afinitu k LDL receptoru, což vede

k zvýšení koncentrace lipidů a lipoproteinů v krvi (Brunzell a Failor 2005). Tato mutace je velmi vzácná, v bělošské populaci se vyskytuje v heterozygotní formě ve frekvenci 1:500 až 1:700, u pacientů s těžkými metabolickými poruchami se vyskytuje ve frekvenci 1:100. U těchto pacientů dochází k rozvoji hypercholesterolemie a aterosklerózy (Brunzell a Failor 2005).

Výsledky genetické analýzy pacientů s časnou parodontitidou byly poměrně překvapivé. Zjistili jsme, že u devíti pacientů skupiny B (s těžší formou časně parodontitidy) byly přítomny rizikové alely *apo ε2*, *apo ε4* a nebo *apoB -100 Arg3500Gln*. Naopak pouze u jednoho pacienta ze skupiny A (s mírným průběhem onemocnění) byly zjištěny *apo ε2* a *apo ε4*. Zvýšené genetické riziko rozvoje hyperlipoproteinémie (homozygotní kombinace *apo ε2*) a hypercholesterolemie (*apo B -100 Arg3500Gln*) bylo zjištěno u dvou pacientů skupiny B. U ostatních pacientů není riziko rozvoje těchto onemocnění tak významné vzhledem k heterozygotní kombinaci alel. Přesto jsou tyto výsledky překvapivé a pokud víme, tak dosud nejsou ve světové literatuře publikované.

Výsledky sérologických vyšetření jsme zhodnotili v závislosti na genotypu. U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny signifikantně nižší koncentrace LDL a cholesterolu a nižší koncentrace HDL a triglyceridů než u pacientů *apo ε2-*. Hladiny LDL byly nižší než je fyziologické rozmezí a souvisejí se sníženou degradací VLDL u *apo ε2+* pacientů (Brunzell a Failor 2005).

U pacientů *apo ε4+* byly detekovány nižší hladiny LDL, HDL, cholesterolu a triglyceridů než u pacientů *apo ε4-*. Dva z pacientů *apo ε4+* jsou léčeni s hypertenzí a s vysokými hladinami cholesterolu, proto mohly být výsledky vyšetření ovlivněny léčbou. Snížené hladiny HDL byly detekovány u *apo ε4+* osob než u *apo ε3+* osob v práci Sorli a spol. (2006).

Analýzou našich předchozích výsledků (Bártová a spol. 2001) jsme zjistili, že signifikantně vyšší koncentrace ox-LDL byly detekovány v sérech *apo ε4+* pacientů s časnou parodontitidou na počátku jejich léčby než u *apo ε4-* pacientů. Tyto hodnoty byly vyšší než je fyziologické rozmezí. Jelikož je ox-LDL zahrnuto v patogenezi aterosklerózy, představují jeho zvýšené hladiny riziko pro tyto pacienty.

Z našich současných výsledků vyplývá, že u většiny pacientů s časnou parodontitidou dosud nedochází ke změnám vedoucím k rozvoji aterosklerózy, nicméně podrobnější vyšetření by bylo vhodné u dvou pacientek s *apo ε2* homozygotním genotypem, u kterých byly zároveň prokázány nižší hladiny LDL a cholesterolu než je jeho fyziologické rozmezí.

Výsledky této disertační práce mají význam zejména z hlediska prevence. Poukazují na význam preventivních prohlídek mládeže zaměřených na sledování časných změn na parodontu a důležitost včasného zahájení konzervativní léčby u postižených jedinců. Naše výsledky ukazují i význam imunologického vyšetření, které by mělo být provedeno ještě před zahájením terapie a mělo by být zaměřeno na sledování funkce neutrofilních granulocytů, expresi povrchových molekul (CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD15), které pomůže odhalit včas závažné formy onemocnění a přizpůsobit tomuto nálezu léčbu pacientů. Při vzniku onemocnění hraje úlohu i genetická predispozice a proto je důležité i vyšetření sourozenců pacientů.

9. ZÁVĚRY

Zadání této disertační práce bylo definováno cíly uvedenými na straně 44. Souhrnně řečeno, mělo její řešení navazující na předchozí dlouhodobý výzkum, potvrdit

- vztah mezi rizikovým genotypem, přítomností patogenních bakterií a progresí onemocnění
- přítomnost defektu neutrofilních granulocytů u pacientů s časnou parodontitidou
- význam Th1 a Th2 lymfocytů v progresi onemocnění
- význam polyklonální tvorby imunoglobulinů v patogenezi onemocnění
- vztah mezi parodontitidou a aterosklerózou

V kontextu s tímto zadáním vedou výsledky práce k těmto závěrům:

- V průběhu desetileté léčby 20 pacientů s časnou parodontitidou (early-onset periodontitis) došlo díky konzervativní terapii a pravidelné domácí péči o parodont ke stabilizaci onemocnění u 15 osob s časnou parodontitidou. Progrese onemocnění byla naopak zjištěna u pěti pacientů.
- Pacienti byli ve čtvrtém roce studie rozděleni na základě klinického stavu na skupinu A (s mírnou formou onemocnění) a skupinu B (s těžší formou onemocnění). Signifikantně vyšší hodnoty gingiválního indexu a počtu parodontálních chobotů byly opakovaně zjištěny u skupiny B než u skupiny A.
- IL-1 kombinovaný genotyp, tj. kombinace alely – 2 genu pro IL-1A (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici -889) a alely – 2 genu pro IL-1B (s nukleotidovou záměnou C → T v pozici +3953), byl detekován u 60 % pacientů. Vyšší výskyt IL-1 kombinovaného genotypu byl zjištěn u pacientů skupiny B. Potvrdili jsme tak vazbu mezi IL-1 kombinovaným genotypem a progresí onemocnění.
- V posledním roce studie jsme detekovali patogenní bakterie v parodontálních chobotech, případně v gingiválním sulku pacientů. Zjistili jsme přítomnost bakterií *Treponema denticola* u 81,3 % pacientů, *Porphyromonas gingivalis* u 62,5 % pacientů, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. a.*) u 50 % pacientů, *Porphyromonas intermedia* u 43,8 % pacientů a *Tannerella forsythia* u 31,3 % pacientů. Bakterie *T. denticola* a *A. a.* převládaly u pacientů skupiny A, kdežto *T. denticola* a *P. gingivalis* převládaly u pacientů skupiny B.

- Vyšší výskyt patogenních bakterií byl nalezen u pacientů s IL-1 kombinovaným genotypem než u pacientů bez něj.
- Metodou INT byla detekována produkce kyslíkových radikálů neutrofilními granulocyty. Nižší hodnoty indexu INT než je jeho fyziologické rozmezí byly detekovány u 90 % pacientů na počátku terapie a u 53 % pacientů po pěti letech léčby. Nicméně u 67 % pacientů došlo ke zvýšení hodnot indexu INT v průběhu léčby.
- Signifikantně vyšší tvorba IFN- γ a signifikantně nižší tvorba IL-4 byla zjištěna u zdravých sourozenců než u pacientů po 24 hodin stimulaci mononukleárních buněk *E. coli* a *A. a.*
- Počet buněk produkujících cytokiny IL-4, IL-6, IL-10 a IFN- γ byl sledován metodou ELISPOT po stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve 3, 5 a 7 dní standardním kmenem *E. coli*, standardním kmenem *A. a.* a kmenem *A. a.* izolovaným z gingiválního sulku daného pacienta či zdravé kontrolní osoby. U zdravých osob byla kinetika reakce (tj. počet buněk produkujících cytokiny v průběhu třetí až sedmý dne stimulace) nezávislá na použitém bakteriálním kmenu. Signifikantní pokles počtu buněk produkujících IL-6 a IL-4 byl zjištěn u pacientů po stimulaci standardním kmenem *A. a.* v porovnání se stimulací vlastním kmenem *A. a.* Po stimulaci standardním kmenem *A. a.* došlo i k poklesu počtu buněk tvořících IL-10 a IFN- γ než po stimulaci vlastním kmenem *A. a.*
- Zatímco počet buněk produkujících cytokiny byl podobný u pacientů a zdravých osob, koncentrace cytokinů zjištěná metodou ELISA byla signifikantně vyšší u zdravých osob než u pacientů.
- Koncentrace imunoglobulinů IgM byla po stimulaci *E. coli* a *A. a.* signifikantně vyšší u zdravých osob než u pacientů. Po stimulaci vlastním kmenem *A. a.* byla u zdravých osob zjištěna vyšší koncentrace IgA, avšak nižší produkce IgM a IgG než u pacientů.
- Po stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pokeweem mitogenem (PWM) dochází k polyklonální tvorbě imunoglobulinů. Po stimulaci PWM a concanavalinem A (ConA) dochází k signifikantnímu poklesu hladin polyklonálně tvořených imunoglobulinů u zdravých osob, naopak k signifikantnímu vzestupu koncentrace imunoglobulinů po PWM+ConA u pacientů na počátku léčby. V průběhu terapie došlo u pacientů s EOP k upravení imunitní reakce tak, že u většiny pacientů byla detekována inhibice tvorby imunoglobulinů po PWM stimulaci^{+Con A}.
- V dlouhodobé studii se nám nepodařilo prokázat vztah mezi progresí časné parodontitidy a hodnotou inhibičního indexu.

- Produkce IgA po PWM stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve pacientů signifikantně rostla v průběhu desetileté léčby a korelovala se zlepšením klinického stavu parodontu.
- Naše zkušenosti s vyšetřováním tvorby imunoglobulinů po polyklonální stimulaci i se sledováním inhibice jejich tvorby byly aplikovány na zjištění vlivu infuze intravenózních imunoglobulinů u pacientů s primárním imunodeficitem. U pacientů s IgG selektivním imunodeficitem (IgGSD) byla zjištěna po PWM stimulaci signifikantně vyšší polyklonální tvorba IgA a IgM než u zdravých osob. Působením infuze intravenózních imunoglobulinů došlo k poklesu koncentrací IgA a IgM. U pacientů s běžným variabilním imunodeficitem (CVID) byly detekovány po PWM stimulaci vyšší hodnoty IgM a IgG, ale nižší hladiny IgA než u zdravých kontrol. Působením infuze došlo k poklesu pouze produkce IgM.
- Po stimulaci buněk PWM+ConA došlo k signifikantní inhibici tvorby imunoglobulinů u zdravých osob. U pacientů s imunodeficity před infúzí nedošlo k inhibici tvorby imunoglobulinů po PWM stimulaci. Po aplikaci infúze došlo k inhibici tvorby IgG u IgGSD pacientů, ale ne u CVID pacientů. Lymfocyty aktivované ConA produkovaly supresivní faktory, které spolu s IVIG infúzí ovlivňovaly jak stimulaci tak inhibici tvorby imunoglobulinů *in vitro*.
- Metodou RayBio byla zjištěna produkce cytokinů po pětidenní stimulaci PWM a PWM+ConA u pacientů s EOP. Byly vyšetřeny vzorky od tří pacientů s inhibicí polyklonální tvorby imunoglobulinů a tří pacientů bez inhibice polyklonální tvorby imunoglobulinů. Po stimulaci PWM se tvořilo více IL-1 α , IL-7, IL-15, IL-17, s TNF-RI a IL-6sR než po stimulaci PWM+ConA. Naopak po stimulaci PWM+ConA bylo detekováno více IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TGF- β a TNF- β než po stimulaci PWM.
- U pacientů s normální inhibicí tvorby polyklonálních imunoglobulinů byla detekována po PWM stimulaci také vyšší tvorba cytokinů IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-12 p70, TNF- α a IFN- γ než po PWM+ConA stimulaci. Avšak u pacientů bez inhibice tvorby polyklonálních imunoglobulinů byly tyto cytokiny produkovány ve vyšší koncentraci po PWM+ConA stimulaci než po PWM stimulaci.
- Vyšší koncentrace TNF- α a IL-10 po stimulaci PWM a zároveň vyšší inhibice jejich tvorby po stimulaci PWM+ConA byla zjištěna pomocí multiplexové analýzy u pacientů s normální inhibicí než u pacientů s narušenou inhibicí.
- Parodontitida je jedním z rizikových faktorů pro rozvoj aterosklerózy. U devíti pacientů skupiny B (s těžší formou časně parodontitidy) byly detekovány rizikové

alely pro apolipoprotein *apo ε2*, *apo ε4* a nebo *apoB -100 Arg 3500 Gln*. Pouze u jednoho pacienta ze skupiny A (s mírným průběhem onemocnění) byly zjištěny *apo ε2* a *apo ε4*. Zvýšené genetické riziko rozvoje hyperlipoproteinémie (homozygotní kombinace *apoε2*) a hypercholesterolemie (*apoB -100 Arg 3500 Gln*) bylo zjištěno u dvou pacientů skupiny B.

- U pacientů *apo ε2+* byly zjištěny signifikantně nižší koncentrace LDL a cholesterolu a nižší koncentrace HDL a triglyceridů než u pacientů *apoε2-*. Hladiny LDL, které byly nižší než fyziologické rozmezí, souvisejí se sníženou degradací VLDL u *apoε 2+* pacientů.
- U pacientů *apo ε4+* byly detekovány nižší hladiny LDL, HDL, cholesterolu a triglyceridů než u pacientů *apo ε4-*. Dva z pacientů *apo ε4+* jsou již léčeni v souvislosti s hypertenzí a vysokými hladinami cholesterolu, proto mohly být výsledky touto léčbou ovlivněné.
- Současné výsledky laboratorních vyšetření nenasvědčují možnému rozvoji cévních onemocnění u většiny pacientů s časnou parodontitidou. U dvou osob s výrazně rizikovým genotypem doporučíme interní vyšetření.
- Bylo zavedeno počítačové hodnocení metody RayBio a ELISPOT pomocí obrazové analýzy LUCIA.
- Výsledky této disertační práce mají význam zejména z hlediska prevence. Poukazují na význam preventivních prohlídek mládeže zaměřených na sledování časných změn na parodontu a důležitost včasného zahájení konzervativní léčby u postižených jedinců.

10. SEZNAM LITERATURY

- AAP (The American Academy of Periodontology). Consensus report on periodontal diagnosis and diagnostic aids. Proceedings of the workshop in clinical periodontics. Chicago. American Academy of Periodontology. [1], 23-31. 1989.
- Afar, B., Engel, D. & Clark, E. A. (1992) Activated lymphocyte subsets in adult periodontitis. *J Periodont Res*, **27**, 126-133.
- Akifusa, S., Poole, S., Lewthwaite, J., Hederson, B. & Nair, S. P. (2001) Recombinant *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin proteins are required to interact to inhibit human cell-cycle progression and to stimulate human leukocyte cytokine synthesis. *Infect Immun*, **69**, 5925-5930.
- Albandar, J. J., Brown, L. J. & Loe, H. (1997) Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **68**, 973-981.
- Albandar, J. J., Brown, L. J., Genco, R. J. & Loe, H. (1997) Clinical classification of periodontitis in adolescents and young adults. *J Periodontol*, **68**, 545-555.
- Albandar, J. M., Brown, L. J. & Loe, H. (1996) Dental caries and tooth loss in adolescents with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **67**, 960-967.
- Albandar, J. M. (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*, **29**, 177-206.
- Ali, R. W., Martin, L., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1997) Detection of identical ribotypes of *Porphyromonas gingivalis* in patients residing in the United States, Sudan, Romania and Norway. *Oral Microbiol Immunol.*, **12**, 106-111.
- Allison, A. C., Schorlemmer, H. U. & Bitter-Suermann, D. (1976) Activation of complement by the alternative pathways as a factor in the pathogenesis of periodontal disease. *Lancet*, **ii**.
- Allison, J. P. (1994) CD28-B7 interactions in T cell activation. *Curr Opin Immunol*, **6**, 414-419.
- Anderson, K. V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, **12**, 13-19.

- Anusaksathien, O., Singh, G., Peters, T. J. & Dolby, A. E. (1992) Immunity to self-antigens in periodontal disease. *J Periodontol*, **63**, 194-199.
- Aoyagi, T., Yamazaki, K., Kabasawa-Katoh, Y., Nakajima, T., Yamashita, N., Yoshie, H. & Hara, K. (2000) Elevated CTLA-4 expression on CD4+ T cells from periodontitis patients stimulated with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigen. *Clin Exp Immunol* **119**, 280-286.
- Aramaki, M., Nagasawa, T., Koseki, T. & Ishikawa, I. (1998) Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue. *J Clin Immunol*, **18**, 421-429.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N. & Schwartz, D. A. (2000) TLR4 mutation are associated with edotoxin hyporesponsiveness in human. *Nature Genetics*, **25**, 187-191.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions . *Annals of Periodontology*, **4**, 6.
- Armitage, G. C., Wu, Y., Wang, H. Y., Sorrell, J., di Giovine, F. S. & Duff, G. W. (2000) Low prevalence of a periodontitis - associated interleukin-1 composite genotype in individuals of Chinese heritage. *J Periodontol*, **71**, 164-171.
- Asai, T., Storkus, W. J. & Whiteside, T. L. (2000) Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol*, **7**, 145-154.
- Asikainen, S., Chen, C. & Slots, J. (1996) Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, **11**, 387-394.
- Attström, R. & van der Valden, U. Consensus report on epidemiology. Proceedings of the 1st European Workshop on periodontology. 120. 1994. London: Quintessence.
- Baehni, P. C. (1997) Supportive care of the periodontal patient. *Curr Opin Periodont*, **4**, 151-157.
- Baelum, V., Fajerskov, O. & Manji, F. (1988) Periodontal diseases in adult Kenyans. *J Clin Periodontol.*, **15**, 445-452.

- Baker, P. J., Dixon, M., Evans, R. T., Dufour, L., Johnson, E. & Roopenian, D. C. (1999) CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* **67**, 2804-2809.
- Barr, C., Lopez, M. R. & Rua-Dobles, A. (1992) Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *J Clin Periodontol*, **10**, 794-801.
- Bartová, J. Imunitní mechanismy v patogenezi paradontitidy. 1989. MÚ ČAV Praha.
- Bártová, J., Krejsa, O., Šírová, M., Tlaskalová, H., Procházková, J. & Dušková, J. Local antibodies and cytokine response in cervicular fluid of patients with juvenile periodontitis. [*Advances in Mucosal Immunology, Part B*], 1109-1112. 1995. New York, London, Plenum Press.
- Bártová, J., Krejsa, O., Broukal, Z., Procházková, J. & Venclíková, Z. Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy. Zpráva o řešení grantu IGA MZ ČR č. 1505 - 3. 1996.
- Bártová, J., Procházková, J., Dušková, J., Krejsa, O. & Mrklas, L. Expresse adhesivních molekul na leukocytech u pacientů s juvenilní paradontitidou. Závěrečná zpráva o řešení grantu MZ ČR . 1998.
- Bártová, J., Krátká, Z., Procházková J., Krejsa, O., Dušková, J., Mrklas L., Tlaskalová, H. & Cukrowská, B. (2000) Th1 and Th2 cytokine profile in patients with early onset periodontitis and their healthy siblings. *Med Inflamm*, **9**, 120.
- Bártová, J., Procházková, J., Dušková, J., Benetková, K., Krátká, Z. & Krejsa, O. Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR č. NK - 5006 - 3. 2001.
- Beck, J. D., Offenbacher, S., Williams, R. C., Gibbs, P. & Garcia, R. (1998) Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Annals of Periodontology*, **3**, 127-141.
- Benhammou, K., Lee, M., Strook, M., Sullivan, B., Logel, J., Raschen, K., Gotti, C. & Leonard, S. (2000) [(3)H] Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day. *Neuropharmacology*, **39**, 2818-2829.
- Berg, L., Lampa, J., Rogberg, S., van Vollenhoven, R. & Klareskog, L. (2001) Increased peripheral T cell reactivity to microbial antigens and collagen type II in rheumatoid arthritis after treatment with soluble TNF-alpha receptors. *Ann Rheum Dis*, **60**, 133-139.

- Berglundh, T., Liljenberg, B., Tarkowski, A. & Lindhe, J. (1998) Local and systemic TCR V gene expression in advanced periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **25**, 125-133.
- Berglundh, T., Wellfelt, B., Liljenberg, B., Tarkowski, A. & Lindhe, J. (2002) The presence of local and circulating autoreactive B cells in patients with advanced periodontitis. *J Clin Immunol*, **29**, 281-286.
- Berglundh, T. & Donati, M. (2005) Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*, **32**, 87-107.
- Bergstrom, J., Eliasson, S. & Dock, J. (2000) A 10-years prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*, **8**, 1338-1347.
- Biasi, D., Bambara, L. M., Carletto, A., Andrioli, G., Urbani, G. & Bellavite, P. (1999) Neutrophil migration, oxidative metabolism and adhesion in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, **26**, 563-568.
- Bick, P. H., Carpenter, A. B., Holdman, L. V., Miller, C. A., Ranney, R. R., Palcanis, K. G. & Tew, J. G. (1981) Polyclonal B-cell activation induced by extract of gram-negative bacteria isolated from periodontally diseased sites. *Infect Immun*, **34**, 43-49.
- Bird, P. S., Gemmell, E., Polak, B., Paton, R. G., Sosroseno, W. & Seymour, G. J. (1995) Protective immunity to *Porphyromonas gingivalis* infection in a murine model. *J Periodontol*, **66**, 351-362.
- Blacker, D. & Tanzi, R. E. (1998) The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol*, **55**, 294-296.
- Blix, I. J., Helgeland, K., Kahler, K. & Lyberg, T. (1999) LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the expression of beta-2 integrins and L-selectin in *ex vivo* human whole blood system. *European Journal of Oral Sciences*, **107**, 14-20.
- Bochud, P. Y., Hawn, T. R. & Aderem, A. (2003) Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J Immunol*, **170**, 3451-3454.
- Borrell, L. N. & Papapanou, P. N. (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*, **32**, 132-158.
- Boyum, A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, **97**, 31-50.

- Brunzell, J. D. & Failor, R. A. (2005) Diagnosis and treatment of dislipidemia. In *Metabolism*. WebMD Inc.
- Chang, J. C., Distler, S. G. & Kaplan, A. M. (1990) Tobacco smoke suppresses T cells but not antigen - presenting cells in the lung-associated lymph nodes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **102**, 514-523.
- Chen, X., Wolff, L., Aeppli, D., Guo, Z., Luan, W., Baelum, V. & Fejeskov, O. (2001) Cigarette smoking, salivary /gingival crevicular fluid cotinine and periodontal status. A 10-year longitudinal study . *J Clin Periodontol*, **28**, 331-339.
- Chiu, B. (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*, **138**, 534-536.
- Choi, J. I., Kang, H. S., Park, Y. M., Kim, S. J. & Kim, U. S. (2004) Identification of T-cell epitopes of *Porphyromonas gingivalis* heat-shock protein 60 in periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, **19**, 1-5.
- Christgau, M., Palitzsch, K. D., Schmalz, G., Kreiner, U. & Frenzel, S. (1998) Healing response to non-surgical periodontal therapy in patients with diabetes mellitus: clinical, microbiological, and immunological results . *J Clin Periodontol*, **2**, 112-124.
- Chung, S. W., Kang, H. S., Park, H. R., Kim, S. J. & Choi, J. I. (2003) Immune responses to heat shock protein in *Porphyromonas gingivalis* - infected periodontitis and atherosclerosis patients. *J Periodont Res*, **38**, 388-393.
- Civeira, F., Pocovi, M., Cenarro, A., Casao, E., Vilella, E. & Ordovas, J. M. (1996) Apo E variants in patients with type III hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis*, **127**, 273-282.
- Costerton, J. V., Lewandowski, Z., De Beer, D., Caldwell, D., Korber, V. & James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*, **176**, 2137-2142.
- Cugini, M. A., Haffajee, A. D., Smith, C., Kent, R. L. J. & Socransky, S. S. (2000) The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *J Clin Periodontol*, **27**, 30-36.
- Cullinan, M. P., Westerman, B., Hamlet, S. m., Palmer, J. E., Faddy, M. J., Lang, N. P. & Seymour, G. J. (2001) A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population . *J Clin Periodontol*, **28**, 1137-1144.

- Cutler, C. W., Arnold, R. R. & Van Dyke, T. E. (1991) Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patients. A case report. *J Periodontol*, **62**, 394-401.
- Cutler, C. W., Jotwani, R., Palucka, A. K., Davoust, J., Bell, D. & Banchereau, J. (1999) Evidence and a novel hypothesis for the role of dendritic cells and *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis. *J Periodont Res*, **34**, 406-412.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M. & Trinchieri, G. (1993) Interleukin-10 inhibits human lymphocyte interferon- γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor / IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, **178**, 1041-1048.
- D'Auito, F., Ready, D. & Tonetti, M. S. (2004) Periodontal disease and C-reactive protein associated cardiovascular risk. *J Periodontal Res*, **39**, 236-241.
- Daniel, M. A., McDonald, G., Offenbacher, S. & Van Dyke, T. E. (1993) Defective chemotaxis and calcium response in localized juvenile periodontitis neutrophils. *J Periodontol*, **64**, 617-621.
- Dasanayake, A. P. (1998) Poor periodontal health of the pregnant woman as a risk factor for low birth weight. *Ann Periodontol*, **3**, 206-212.
- De Stefano, F., Anda, R. F., Kahn, H. S., Williamson, D. F. & Russell, C. M. (1993) Dental disease and risk of coronary hearth disease and mortality. *Br Med J*, **306**, 688-691.
- Del Prete, G. F., de Carli, M., Ricci, M. & Romagnani, S. (1991) Helper activity for immunoglobulin synthesis of Th1 and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J Exp Med*, **174**, 809-813.
- Delaney, J. E. & Kornman, K. S. (1987) Microbiology of subgingival plaque from children with localized prepubertal periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, **2**, 71-76.
- Dixon, D. R., Bainbridge, B. & Darveau, R. (2004) Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol 2000*, **35**, 53-74.
- Donaldson, K., Brown, G. M., Drost, E., Selby, C. & MacNee, W. (1991) Does cigarette smoke enhance the proteolytic activity of neutrophils? *Annals of New York Academy of Science*, **624**, 325-327.
- Ebersole, J. & Cappelli, D. (1994) Gingival crevicular fluid antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, **9**, 335-344.

- Eichner, J., Dunn, S. T., Perveen, D. M., Thmpson, D. M., Stewart, K. E. & Stroehla, B. C. (2002) Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: A HuGe Review. *Am J Epidemiol*, **155**, 487-495.
- Engebretson, S. P., Lamster, I. B., Herrera-Abreu, M., Celenti, R. S., Timms, J. M., Chaudhary, A. G., di Giovine, F. S. & Kornman, K. S. (1999) The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin -1 beta and tumor necrosis factor – alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol*, **70**, 567-573.
- Etzionni, A. & Tonetti, M. S. (2000) Leukocyte adhesion deficiency II - from A to almost Z. *Immunol Rev*, **178**, 138-147.
- Fiehn, N. E. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. Larsen, T., Christiansen, N., and Holmstrup, P. (2005) *J Periodontol*, **76**, 731-736.
- Fletcher, J., Reddi, K., Poole, S., Nair, S. P., Henderson, B., Tabona, P. & Wilson, M. (1997) Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *J Periodontal Res*, **32**, 200-205.
- Ford, P., Gemmell, E., Walker, P., West, M., Cullinan, M. & Seymour, G. J. (2005) Characterization of heat shock protein-specific T cells in atherosclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **12**, 259-267.
- Ftis, A., Singh, G. & Dolby, A. E. (1986) Antibody to collagen type I in periodontal disease. *J Periodontol*, **57**, 693-698.
- Fujihashi, K., Yamamoto, M., McGhee, J. R. & Kiyono, H. (1994) Type 1 / Type 2 cytokine production by CD4+ T cells in adult periodontitis. *Dent Res*, **73**, 204.
- Garlet, G. P., Martins Jr, W., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. & Silva, J. S. (2003) Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodont Res*, **38**, 210-217.
- Gause, W. C., Halvorson, M. J., Lu, P., Greenwald, R., Linsley, P., Urban, J. F. & Finkelman, F. D. (1997) The function of costimulatory molecules and the development of IL-4 producing T cells. *Immunol Today*, **18**, 115-120.
- Geatch, D. R., Harris, J. I., Heasman, P. A. & Taylor, J. J. (1999) *In vitro* studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, **34**, 70-78..

- Gejewski, T. F. & Fitch, F. W. (1988) Anti-proliferative effect of IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol*, **140**, 4245-4252.
- Gemmell, E. & Seymour, G. J. (1991) Phenotypic analysis of B-cells extracted from human periodontal disease tissue. *Oral Microbiol Immunol*, **6**, 356-362.
- Gemmell, E., Feldner, B. & Seymour, G. J. (1992) CD45RA and CD45RO positive CD4 cells in human peripheral blood and periodontal disease tissue before and after stimulation with periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, **7**, 84-88.
- Gemmell, E., Kjeldsen, M., Yamazaki, K., Nakajima, T., Aldred, M. J. & Seymour, G. J. (1995) Cytokine profiles of *Porphyromonas gingivalis* - reactive T lymphocyte line and clones derived from *P. gingivalis* - infected subjects. *Oral Dis*, **1**, 139-146.
- Gemmell, E., Marshall, R. I. & Seymour, G. J. (1997) Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **14**, 112-143.
- Gemmell, E. & Seymour, G. J. (2004) Immunoregulatory control of Th1 / Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000*, **35**, 21-41.
- Getka, T. P., Alexander, D. C., Parker, W. B. & Miller, G. A. (1996) Immunomodulatory and superantigen activities of bacteria associated with adult periodontitis. *J Periodontol*, **67**, 909-917.
- Glick, M., Muzyka, B. C., Salkin, L. M. & Lurie, D. (1994) Necrotizing ulcerative periodontitis: a marker for immune deterioration and a predictor for the diagnosis of AIDS. *J Periodontol*, **65**, 393-397.
- González, J. R., Michel, J., Rodriguez, E. L., Herrmann, J. M., Bodeker, R. H. & Meyle, J. (2003) Comparison of interleukin-1 genotypes in two populations with aggressive periodontitis. *Eur J Oral Sci*, **111**, 395-409.
- Gorlin, R. J., Cohen, M. M. & Hennekam, R. C. (2001) Syndromes of the head and neck. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Gorska, R., Gregorek, H., Kowalski, J., Laskus- Perendyk, A., Syczewska, m. & Madalinski, K. (2003) Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, **30**, 1046-1052.

- Goulhen, F., Grenier, D. & Mayrand, D. (2003) Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections . *Reviews in Oral Biology and Medicine*, **399**.
- Goutoudi, P., Diza, E. & Arvanitidou, M. (2004) Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*, **32**, 511-520.
- Graves, D. T. & Cochran, D. L. (2003) The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factors to periodontal tissue destruction . *J Periodontol*, **74**, 391-401.
- Guerkov, R. E., Targoni, O. S., Kreher, C. R., Boehm, B. O., Herrera, M. T., Tary - Lehmann, P. V. & Schwander, S. K. (2003) Detection of low-frequency antigen-specific IL-10 - producing CD4(+) T cells via ELISPOT in PBMC: cognate vs. nonspecific production of the cytokine . *J Immunol Methods*, **279**, 111-121.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*, **5**, 78-111.
- Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (2001) Relationship of cigarette smoking to the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*, **28**, 377-388.
- Hagiwara, E., Abbasy, F., Mor, G., Ishigatsubo, Y. & Klinman, D. M. (1995) Phenotype and frequency of cells secreting IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN and TNF in human peripheral blood. *Cytokine*, **7**, 815-822.
- Hagiwara, E., Sacks, T., Leitman-Klinman, S. F. & Klinman, D. M. (1996) Effects of HIV infection on the frequency of cytokine - secreting cells in human peripheral blood. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **12**, 127-133.
- Haraszthy, V. I., Zambon, J. J., Trevisan, M., Zeid, M. & Genco, R. J. (2000) Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, **71**, 1560.
- Hart, T. T., Marazita, M. M., McCanna, K. K., Schenkein, H. A. & Diehl, S. R. (1993) Reevaluation of the chromosome 4q candidate region for early-onset periodontitis. *Human Genet*, **91**, 416-422.
- Haynes, W. G. & Stanford, C. (2003) Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1309-1311.
- Heitz-Mayfield, L. J. A. (2005) Disease progression: identification of high - risk groups and individuals for periodontitis . *J Clin Periodontol*, **32 (Suppl.6)**, 196-209.

- Hirsch, H. Z., Tarkowski, A., Miller, E. J., Gay, S., Koopman, W. J. & Mestecky, J. (1988) Autoimmunity to collagen in adult periodontal disease. 17 edition. 456-459.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J. & Vogel, S. N. (2001) Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, **69**, 1477-1482.
- Hodge, P., Riggio, M. P. & Kinane, D. F. (2001) Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, **28**, 430-436.
- Holla, L. I., Fassmann, A., Benes, P., Halabala, T., Znojil, V. & Vacha, J. (2002a) 5 polymorphisms in the transforming growth factor-beta 1 gene (TGF-beta 1) in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, **29**, 336-341.
- Holla, L. I., Buckova, D., Fassmann, A., Halabala, T., Vasku, A. & Vacha, J. (2002b) Promoter polymorphism in the CD14 receptor gene and their potential associations with the severity of chronic periodontitis. *Journal of Medical Genetics*, **39**, 844-848.
- Holla, L. I., Jurajda, M., Fassman, A., Dvorakova, N., Znojil, V. & Vacha, J. (2004a) Genetic variations in the matrix metalloproteinase-1 promoter and risk of susceptibility and / or severity of chronic periodontitis in the Czech population. *J Clin Periodontol*, **31**, 685-690.
- Holla, L. I., Fassman, A., Stejskalova, A., Znojil, V., Vanek, J. & Vacha, J. (2004b) Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, **75**, 30-36.
- Holla, L. I., Fassman, A., Stejskalova, A., Znojil, V., Vanek, J. & Vacha, J. (2004c) Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, **75**, 30-36.
- Hořejší, V. & Bartůňková, J. (1998) *Základy imunologie*. Triton edition. Praha.
- Hou, L., Sasaki, H. & Stashenko, P. (2000) Toll-like receptor 4 - deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun*, **68**, 4681-4687.
- Hughenoltz, P. (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol*, **3**.
- Inagaki, K., Krall, E. A., Fleet, J. C. & Garcia, R. I. (2003) Vitamin D receptor alleles, periodontal disease progression, and tooth loss in the VA dental longitudinal study. *J Periodontol.*, **74**, 161-167.

- Isogai, E., Kimura, K., Fujii, N., Takagi, S., Hirose, K. & Hayashi, M. (1996) *In vivo* induction of apoptosis and immune responses in mice by administration of LPS from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, **64**, 1461-1466.
- Ivanyi, L. & Lehner, T. (1970) Lymphocyte transformation by sonicates of dental plaque in human periodontal disease. *Arch Oral Biol*, **15**, 1117-1121.
- Jagels, M., Travis, J., Potempa, J., Pike, R. & Hugli, T. E. (1996) Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, **64**, 1984-1991.
- Janket, S. J., Baird, A., Chung, S. W. & Jones, J. A. (2003) Meta analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg*, **95**, 559-569.
- Jenkins, M. K. & Kinane, D. F. (1989) The 'high risk' group in periodontitis. *J Dent*, **22**, 168-171.
- Jenkins, M. K. & Johnson, J. G. (1993) Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr Opin Immunol*, **5**, 361-367.
- Jonsson, R., Pitts, A., Lue, C., Gay, S. & Mestecky, J. (1991) Immunoglobulin isotype distribution of locally produced autoantibodies to collagen type I in adult periodontitis. Relationship to periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, **18**, 703-707.
- Kamma, J. J. & Baehni, P. C. (2003) Five-years maintenance follow-up of early -onset periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, **30**, 562-572.
- Kamma, J. J., Nakou, M., Gmur, R. & Baehni, P. C. (2004) Microbiological profile of early onset / aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*, **19**, 314-321.
- Kanik, K. S., Hagiwara, E., Yarboro, C. H., Schumacher, H. R., Wilder, R. I. & Klinman, D. M. (1998) Distinct patterns of cytokine secretion characterize new onset synovitis versus chronic rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, **25**, 16-22.
- Kantor, A. B. (1991) The development and repertoire of B-1 cells (CD5B cells). *Immunology today*, **12**, 389-391.
- Katz, J., Ward, D. C. & Michalek, S. M. (1996) Effect of host responses on the pathogenicity of strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, **5**, 309-318.
- Kawai, T., Paster, B. J., Goncalves, R. B., Napimoga, M. H., Nakanishi, T. & Taubman, M. A. (2005) Immunopathology of commensal host-bacterial relationship in oral cavity.

In *12th international congress of mucosal immunology - From fundamental biology to human disease*. pp. 52484. Boston, Massachusetts: Boston Marriott Copley Place.

Kengatharan, K. M., De Kimpe, S., Robson, C., Foster, S. J. & Thiemermann, C. (1998) Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med*, **188**, 305-315.

Kinane, D. F., Hodge, P., Eskdale, J., Ellis, R. & Gallagher, G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 34, 379-386. 1999.

Kinane, D. F. & Chestnutt, I. (2000) Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **11**, 356-365.

Kinane, D. F. & Hart, T. C. (2003) Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **14**, 430-449.

Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., Nakagawa, N. & Suda, T. (2000) Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF / RANKL - RANK interaction. *J Exp Med*, **191**, 275-286.

Kobayashi, T., Westerdaal, N. A., Miyazaki, A., van der Pol, W. L., Suzuki, T., Yoshie, H., van der Winkel, J. G. & Hara, K. (1997) Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun*, **65**, 3556-3560.

Kondo, N., Ozawa, T. & Mushiake, K. (1991) Suppression of immunoglobulin production of lymphocytes by intravenous immunoglobulin. *J Clin Immunol*, **11**, 158.

Konopka, T. (2004) Periodontitis and preterm low birth weight. *Ginekol Pol*, **75**, 397-403.

Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G. J., Higginbottom, F. L. & Duff, G. W. (1997) The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Periodontology 2000*, **14**, 33-53.

Krátká, Z. Imunitní mechanismy v patogenezi parodontitidy - diplomová práce. 1998. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova.

- Krátká, Z., Bártová, J., Kryštůfková, O., Benetková, K., Mrklas, L. & Fučíková, T. (200?) Effect of intravenous immunoglobulins on in vitro immunoglobulin formation in patients with antibody immunodeficiency. *APMIS*, **110**, 205-213.
- Krátká, Z., Bártová, J., Krejsa, O., Otčenášková, M., Janatová, T. & Dušková, J. (2006) Interleukin -1 gene polymorphisms and a 10-year study of patients with early - onset periodontitis. *v tisku*.
- Krejsa, O., Dušková, J., Bártová, J. & Šmausová, R. Studium onemocnění parodontu v mladém věku se zřetelem na objektivizaci diagnostických kritérií aktivity procesu. Závěrečná zpráva o řešení grantu Interní grantové agentury MZ ČR, 0035-2. 1993. VÚS Praha.
- Krejsek, J. & Kopecký, O. (2004) *Klinická imunologie*. Nucleus HK.
- Kurita-Ochiai, T., Fukushima, K. & Ochiai, K. (1997) Butylic acid -induced apoptosis of murine thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells . *J Dent Res*, **65**, 35-41.
- Lai, M. K., Tsang, S. W., Garcia - Alloza, M., Minger, S. L., Nicoll, J. A. & Francis, P. T. (2006) Selective effects of the APOE ε4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, **8**.
- Lalla, E., Lamster, I. B., Hofmann, M. A., Bucciarell, L., Jerud, A. P. & Schmidt, A. M. (2003) Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1405-1411.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J. & Billings, P. C. (1997) RTX toxins recognize a beta 2 integrin on the surface of human target cells. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 30463-30469.
- Lang, N. P., Tonetti, M. S., Suter, J., Sorrell, J., Duff, G. W. & Kornman, K. S. (2000) Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodont Res*, **35**, 102-107.
- Lindhe, J., Westfelt, E., Nyman, S., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1984) Long-term effect of surgical and nonsurgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, **11**, 448-458.
- Loe, H., Theilade, E. & Jensen, H. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, **36**, 177-187.

- Loos, B. G., John, R. P. & Laine, M. L. (2005) Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, **32** (Suppl. 6), 159-179.
- Löe, H., Anerud, A., Boysen, H. & Morrison, E. (1986) Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*, **5**, 431-445.
- Lundström, A., Jendle, J., Stenstrom, B., Toss, G. & Ravald, N. (2001) Periodontal conditions in 70-year - old women with osteoporis. *Swedish Dental Journal*, **3**, 89-96.
- Mackler, B. F., Frostad, K. B., Robertson, P. B. & Levy, B. M. (1977) Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J Periodont Res*, **12**, 37-45.
- Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A. & Kinane, D. F. (2005) Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*, **32**, 57-71.
- Mahley, R. W. & Huang, Y. (1999) Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer 's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 207-217.
- Mangan, D., Taichman, N. S., Lally, E. T. & Wahl, S. M. (1991) Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun*, **59**, 3267-3272.
- Marazita, M. L., Burmeister, J. A., Gunsolley, J. C., Koertge, T. E., Lake, K. & Schenkein, H. A. (1994) Evidence for autosomal dominant inheritance and race - specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol*, **65**, 623-630.
- Mareček, D. & Procházková, J. (1986) Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie. Avicenum edition. Praha.
- Mattson, E., Verhage, L., Rollof, J., Fler, A., Verhoef, J. & vanDijk, H. (1993) Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor-alpha, interleukin -1 and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **7**, 281-287.
- Mayeux, R., Saunders, A. M., Shea, S., Mirra, S., Evans, D. & Phelps, C. H. (1998) Utility of the apolipoprotein E genotype in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's*

- Disease Centers Consortium on Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.*, **338**, 1325.
- Mc Guire, M. K. & Nunn, M. E. (1999) Prognosis versus actual outcome. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognosis and tooth survival. *J Periodontol*, **70**, 49-56.
- McArthur, J. G. & Raulet, D. H. (1993) CD28 - induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. *J Exp Med*, **178**, 1645-1653.
- McCoy, K. D. & Le Gros, G. (1999) The role of CTLA - 4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*, **77**, 1-10.
- McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S. & Spack, E. G. (1997) A sensitive ELISPOT assay to detect low - frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods*, **210**, 149-166.
- McGhee, M. L., Ogawa, T. & Pitts, A. M. (1989) Analysis of functional mononuclear cells from chronically inflamed gingival tissue. *Reg Immunol*, **2**, 103-110.
- Mealey, B. L. & Rethman, R. B. (2003) Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today*, **22**, 107-113.
- Medzhitov, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, **1**, 135-145.
- Mercanoglu, F., Oflaz, H., Oz, O., Gokbuget, A. Y., Genchellac, H. & Umman, S. (2004) Endothelial dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. *J Periodontol*, **75**, 1694-1700.
- Meurman, J. H., Sanz, M. & Janket, S. J. (2004) Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease . *Crit Rev Oral Biol Med*, **15**, 403-413.
- Meyle, J. (1994) Immunopathogenese der marginalen Parodontitis. *Dtsch Zahnarzt Z*, **4**, 273-277.
- Michalowicz, B. S. (1994) Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, **65**, 479-488.
- Mirbod, S. M., Ahing, S. I. & Pruthi, V. K. (2001) Immunohistochemical study of vestibular gingival blood vessel density and internal circumstance in smokers and non-smokers. *J Periodontol*, **72**, 1318-1323.

- Misumi, M., Hagiwara, E., Takeno, M. & Ishigatsubo, Y. (2003) Cytokine production profile in patients with Behcet's disease treated with infliximab. *Cytokine*, **24**, 210-218.
- Miyawaki, T., Kubo, M., Nagaoki, T., Moriya, N. & Taniguchi, N. (1981) Developmental changes in humoral suppressor activity released from concanavalin A - stimulated human lymphocytes on B cell differentiation. *J Immunol*, **126**, 1720-1723.
- Morrison, H. I., Ellison, L. F. & Taylor, G. W. (1999) Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. *J Cardiovasc Risk*, **6**, 7-11.
- Nakajima, T., Yamazaki, K., Sakurai, K., Gemmell, E., Seymour, G. J. & Hara, K. Detection of clonotypic changes of T cells after stimulation with *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 13[4], 238-245. 1998.
- Nickoloff, B. J. & Turka, L. A. (1994) Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today*, **15**, 464-469.
- Niekrash, C. E. (1985) Simultaneous assessment of complement components C3 and C4 and B and further cleavage products in human gingival fluid. Longitudinal changes during periodontal therapy. *J Periodont Res*, **20**, 260-267.
- Niesengard, R. J. & Newman, M. G. (1994) *Oral microbiology and immunology*. Philadelphia: W.b.Sounders Comp.
- Noack, B., Genco, R. J., Trevisan, M., Grossi, S. G., Zambon, J. J. & De Nardin, E. (2001) Periodontal infection contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol*, **72**, 1221-1227.
- Noelle, R. J. & Snow, E. C. (1991) Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol Today*, **11**, 361-368.
- Norderyd, O., Hugoson, A. & Grusovin, G. (1999) Risk of severe periodontal disease in a Swedish adult population. A longitudinal study. *J Clin Periodontol*, **26**, 608-615.
- O'Neill, L. A. (2002) Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol*, **23**, 296-300.
- Oettinger, O., Barak, S., Ohel, G., Oettinger, M., Kreutzer, H., Peled, M. & Machtei, E. E. (2005) Severe pregnancy complication (preeclampsia) is associated with greater periodontal destruction. *J Periodontol*, **76**, 134-137.

- Ogawa, T., Tarkowski, A. & McGhee, M. L. (1989) Analysis of IgG and IgA subclass antibody secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J Immunol*, **142**, 1150-1158.
- Ohyama, H., Matsushita, S., Kato, N., Nishimura, F., Oyaizu, K., Koikeguchi, S., Kurihara, H., Takashiba, S. & Murayama, Y. (1998) T cell responses to 53-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* in human with early-onset periodontitis. *Hum Immunol*, **59**, 635-643.
- Okada, M., Hayashi, F., Soda, Y., Zhong, X., Miura, K. & Kozai, K. (2004) Intra-familial distribution of nine putative periodontal pathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *Journal Oral Science*, **46**, 149-156.
- Oliver, R. C. & Tervonen, T. (1994) Periodontitis and tooth loss: comparing diabetics with the general population. *J Am Dent Assoc*, **12**, 71-76.
- Oliver, R. C., Brown, L. J. & Loe, H. (1998) Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*, **69**, 269-278.
- Pabst, M. J., Pabst, K. M., Collier, J. A., Coleman, T., Lemons-Prince, M. L., Godat, M., Waring, M. B. & Babu, J. P. (1995) Inhibition of neutrophil and monocyte defensive function by nicotine. *J Periodontol*, **66**, 1047-1055.
- Page, R. C., Bowen, T. & Altman, L. (1983) Prepubertal periodontitis I. Definition of a clinical disease entity. *J Periodontol*, **54**, 257-271.
- Page, R. C. (1991) The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res*, **26**, 230-242.
- Page, R. C. & Beck, J. D. (1997) Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, **47**, 61-87.
- Palmer, R. M., Watts, T. L. & Wilson, R. F. (1996) A double blind trial of tetracycline in management of early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, **23**, 670-674.
- Palmer, R. M., Wilson, R. F., Hasan, A. S. & Scott, D. A. (2005) Mechanisms of actions of environmental factors - tobacco smoking. *J Clin Periodontol*, **32**, 195.
- Panaro, M. A. & Mitolo, V. (1999) Cellular responses to fMLP challenging: a minireview. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **21**, 397-419.

- Parkhill, J. M., Hennig, B. J., Chapple, I. L., Heasman, P. A. & Taylor, J. J. (2000) Association of interleukin -1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, **27**, 682-689.
- Patters, M. R., Chen, P., Mc Kenna, J. & Genco, R. J. (1980) Lymphoproliferative responses to oral bacteria in humans with varying severities of periodontal disease. *Inf Immun*, **28**, 784.
- Payne, J. B., Reinhardt, R. A., Nummikoski, P. V. & Patil, K. D. (1999) Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic / osteopenic women. *Osteoporos Int*, **10**, 34-40.
- Persson, G. R. (2005) Immune responses and vaccination against periodontal infections. *J Clin Periodontol*, **32**, 39-53.
- Petit, M. D., van Steenberghe, T. J. M., de Graaff, J. & van der Valden, U. (1993) Transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families of adult periodontitis patients. *J Periodont Res*, **28**, 335-345.
- Pihlström, B. L., McHugh, R. B., Oliphant, T. H. & Ortiz-Campos, C. (1983) Comparison of surgical and non surgical treatment of periodontal disease. A review of current studies and additional results after 6 1/2 years. *J Clin Periodontol*, **10**, 524-541.
- Preber, H. & Bergstrom, J. (1986) Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. *Scan J Dent Res*, **94**, 102-108.
- Procházková, J., Bártová, J., Krejsa, O., Šmausová, R., Dušková, J. & Mrklas, L. Changes in neutrofil function in patients with early-onset periodontitis according to the family occurrence of the disease. *Advances in Mucosal Immunology, PartB*, 1127-1129. 1995. New York, London, Plenum Press.
- Procházková, J., Bártová, J., Krejsa, O., Dušková, J. & Mrklas, L. Genetické a imunologické faktory u pacientů s juvenilní parodontitidou. Závěrečná zpráva o řešení grantu IGA MZ ČR č. 1503-3. 1996. VÚS Praha.
- Pussinen, P. J., Nyssonen, K., Alfthan, G., Salonen, R., Laukkanen, J. A. & Salonen, J. T. (2005) Serum antibody levels to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* predict the risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 833-838.
- Quappe, L., Jara, L. & Lopez, N. J. (2004) Association of interleukin-1 polymorphisms with aggressive periodontitis. *J Periodontol*, **75**, 1509-1515.

- Quinn, S. M., Zhang, J., Gunsolley, J. C., Schenkein, H. A. & Tew, J. (1996) Influence of smoking and race on immunoglobulin G subclass concentrations in early-onset periodontitis patients. *Infect Immun*, **64**, 2500-2505.
- Rajapakse, P. S. & Dolby, A. E. (2004) Evidence for local production of antibodies to auto and non-self antigens in periodontal disease. *Oral Dis*, **10**, 99-105.
- Rateitschak, K. H., Rateitschak, E. M., Wolf, H. F. & Hessel, T. M. (1998) *Periodontology. (Color atlas dental medicine 1)*. 2nd English edition. Stuttgart: Thieme, G.
- Reinhardt, R. A., Bolton, R. W., McDonald, T. L., DuBois, L. M. & Kaldahl, W. B. (1988) *In situ* lymphocyte subpopulations from active versus stable periodontal sites. *J Periodontol*, **59**, 656-670.
- Reinhardt, R. A., Payne, J. B., Maze, C. A., Patil, K. D., Gallagher, S. J. & Mattson, S. J. (1999) Influence of estrogen and osteopenia / osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol*, **70**, 823-828.
- Renvert, S. (2003) Destructive periodontal disease in relation to diabetes mellitus, cardiovascular disease, osteoporosis and respiratory disease. *Oral Health Prev Dentist* **1**, Suppl 1, 341-357.
- Rescigno, M., Granucci, F. & Ricciardi - Castagnoli, P. (1999) Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol*, **77**, 404-410.
- Robinson, P. G., Sheiham, A., Challacombe, S. J. & Zakrzewska, J. M. (1992) The periodontal health of homosexual men with HIV infection: a controlled study. *Oral Dis*, **2**, 45-52.
- Rodenburg, J. P., van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Goene, R. J., Abbas, F. & de Graff, J. (1990) Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol*, **17**, 392-399.
- Ronderos, M., Jacobs, D. R., Himes, J. H. & Pihlstrom, B. L. (2000) Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross - sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol*, **10**, 778-786.
- Rose, L. F. & Mealey, B. L. (2004) *Periodontics - Medicine, Surgery and Implantants*. Elsevier Mosby.

- Saarela, M., von Troil-Lindén, B., Stucki, A. M. S. & Asikainen, S. (1993) Transmission of bacterial species between spouses . *Oral Microbiol Immunol*, **8**, 349-354.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, **155**, 1151-1164.
- Schenkein, H. A. & Genco, R. J. (1977) Gingival fluid and serum in periodontal diseases. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 pro-activator /factorB/ and C4 in gingival fluid. *J Periodontol*, **48**, 778-784.
- Schotte, H., Schluter, B., Willeke, P. & Gaubitz, M. (2004) Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of proinflammatory cytokine-secreting peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **43**, 960-964.
- Selby, C., Drost, E., Brown, D., Howie, S. & MacNee, W. (1992) Inhibition of neutrophil adherence and movement by acute cigarette smoke exposure. *Experimental Lung Research*, **18**, 813-827.
- Seshadri, S., Drachman, D. A. & Lippa, C. F. (1995) Apolipoprotein $\epsilon 4$ allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, **52**, 1074-1079.
- Seymour, G. J. & Greenspan, J. S. (1979) The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodont Res*, **14**, 39-46.
- Seymour, G. J., Gemmell, E., Reinhardt, R. A., Eastcott, J. W. & Taubman, M. A. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontal Res* 28, 478-486. 1993.
- Seymour, G. J., Gemmell, E., Westerman, B. & Cullinan, M. (1996) Periodontics into the 21st century. *Adv Exp Med Biol*, **409**, 359-363.
- Shapira, L., Champagne, C. M. E., Van Dyke, T. E. & Amar, S. (1998) Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, **66**, 2736-2742.
- Shibutani, T., Gen, K., Shibata, M., Horiguchi, Y., Kondo, N. & Iwayama, Y. (2000) Long-term follow-up of periodontitis in a patient with Chediak-Higashi syndrome. A case report. *J Periodontol*, **71**, 1024-1028.

- Singh, B., Read, S., Asseman, C., Malmstrom, V., Mottet, C., Stephens, L. A., Štěpánková, R., Tlaskalová - Hogenová, H. & Powrie, F. (2001) Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev*, **182**, 190-200.
- Siveke, J. & Hamann, A. (1998) T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol*, **160**, 550-554.
- Sjödín, B., Matson, L., Unell, L. & Egelberg, J. (1993) Marginal bone loss in the primary dentition of patients with juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, **20**, 32-36.
- Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, **15**, 606-609.
- Slots, J. & Ting, M. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, **20**, 82-121.
- Smith, J. G., Liu, X., Kaufhold, R. M., Clair, J. & Caulfield, M. J. (2001) Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella - zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**, 871-879.
- Smith, G. J., Cross, D. L. & Wray, D. (1995) Comparison of periodontal disease in HIV seropositive subjects and controls. Clinical features. *J Clin Periodontol*, **22**, 558-568.
- Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1991) Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assesment. *J Periodont Res*, **26**, 195-212.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.*, **25**, 134-144.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, C. & Duff, G. W. (2000) Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, **27**, 810-818.
- Soder, B., Jin, L. J. & Wickholm, S. (2002) Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*, **29**, 384-391.
- Sopori, M. L., Goud, N. & Kaplan, A. M. (1994) Effects of tobacco smoke on the immune system. In *Immunotoxicology and Immunopharmacology*. eds. Dean, J. H., Luster, M. I., Munson, A. E., & Kimber, I., pp. 413-434. New York: Raven Press.

- Sorli, J. V., Corella, D., Frances, F., Ramirez, J. B., Gonzalez, J. I. & Portoles, O. (2006) The effect of the APO E polymorphism on HDL - C concentrations depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. *Clin Chim Acta*, **366**, 196-203.
- Soskolne, W. A. & Klinger, A. (2001) The relationship between periodontal diseases and diabetes: and overview. *Annals of Periodontology*, **1**, 91-98.
- Springer, T. T., Thompson, W. W., Miller, L. L., Schmalstieg, F. C. & Anderson, D. C. (1984) Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150.95 glycoprotein family and its molecular basis. *J Exp Med*, **160**, 1901-1918.
- Stamm, J. W. (1986) Epidemiology of gingivitis. *J Clin Periodontol*, **13**, 360-370.
- Steinman, R. M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunopathogenicity. *Annu Rev Immunol*, **9**, 271-296.
- Stengard, J. H., Zerba, K. E., Pekkanen, J., Ehnholm, C., Nissinen, A. & Sing, C. F. (1995) Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation*, **91**, 265-269.
- Suarez, L. J., Ocampo, A. M., Duenas, R. E. & Rodriguez, A. (2004) Relative proportions of T-cell subpopulations and cytokines that mediate and regulate the adaptive immune response in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*, **75**, 1215.
- Sugawara, M., Yamashita, K., Yoshie, H. & Hara, K. (1992) Detection of, and anti-collagen antibody produced by, CD-5 positive B cells in inflamed gingival tissues . *J Periodont Res*, **27**, 489-498.
- Sumida, T., Sakamoto, A., Murata, H., Makino, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., Nishioka, K., Iwamoto, I. & Taniguchi, M. (1995) Selective reduction of T cells bearing invariant V α 24JaQ antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J Exp Med*, **182**, 1163-1168.
- Sundquist, G. K., Carlsson, J., Herrmann, B. F. & Tarnvik, A. (1985) Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black - pigmented Bacteroides. *Journal of Medical Microbiology*, **19**, 85-94.
- Suzuki, J. B., Burger, B. & Falkner, W. (1984) Immunologic profile of juvenile periodontitis. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and spore germination. *J Periodontol*, 461.

- Tabeta, K., Yamazaki, K., Hotokezaka, H., Yoshie, H. & Hara, K. (2000) Elevated humoral response to heat-shock protein-60 family in periodontitis patients. *Clin Exp Immunol*, **120**, 285-293.
- Tada, H., Sugawara, S., Nemoto, E., Takahashi, K., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J., Shimauchi, H. & Takada, H. (2002) Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to down - regulation of lipopolysaccharide - induced interleukin - 8 production. *Infect Immun*, **70**, 3304-3307.
- Takahashi, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 31[5], 311-325. 1998.
- Takashiba, S., Ohyama, H., Oyaizu, K., Kogoe-Kato, N. & Murayama, Y. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res* 34[7], 374-378. 1999.
- Tanner, A. C., Kent, R. Jr., Van Dyke, T. E., Sonis, S. T. & Murray, L. A. (2005) Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. *J Periodontol*, **76**, 573-581.
- Taylor-Robinson, D., Aduse-Opoku, J., Sayed, P., Slaney, J. M., Thomas, B. J. & Curtis, M. A. (2002) Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *Eur J Clin Microbiol Infect Diseases*, **21**, 755-757.
- Temple, T. R., Kimball, H. R., Kakehashi, S. & Amen, C. R. (1972) Host factors in periodontal disease: periodontal manifestations of Chediak-Higashi syndrome. *Periodontal Res*, **7**, 26-27.
- Teng, Y. T., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y. Y., Gorczynski, R. M., Singh, B., Ellen, R. P. & Penninger, J. M. (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*, **106**, 59-67.
- Teng, Y. T. (2002) Mixed periodontal Th1 - Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - specific osteoprotegerin ligand (or RANKL-L) - mediated alveolar bone destruction *in vivo*. *Inf Immun*, **70**, 5269-5273.
- Tew, J. G., Engel, D. & Mangan, D. (1989) Polyclonal B-cell activation in periodontitis. *J Periodont Res*, **24**, 225-241.

- Tezal, M., Wactawski - Wende, J., Grossi, S. G., Ho, A. W., Dunford, R. & Genco, R. J. (2000) The relationship between bone mineral density and periodontitis in post menopausal women. *J Periodontol*, **9**, 1492-1498.
- Thornton, A. E. & Shewach, E. M. (1998) CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin-2 production. *J Exp Med*, **188**, 287-296.
- Tlaskalová - Hogenová, H., Bártová, J., Mrklas, L., Manal, P., Broukal, Z., Barot -Ciorbaru, R., Novák, M. & Hanikýřová, G. (1985) Stimulation of human blood lymphocytes by different polyclonal B cell activators of bacterial and plant origin: production of IgM, IgG and IgA estimated by ELISA method. *Folia Microbiol*, **30**, 258-266.
- Travis, J., Pike, R., Imamura, T. & Potempa, J. (1997) *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodont Res*, **32**, 120-125.
- Ueki, K., Tabada, K., Yoshie, H. & Yamazaki, K. (2002) Self heat-shock protein 60 induces tumor necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, **127**, 72-77.
- Van Dyke, T. E., Wilson - Burrows, C., Offenbacher, S. & Henson, P. (1987) Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease with a cell surface protein. *Infect Immun*, **55**, 2262-2267.
- Van Dyke, T. E. & Champagne, C. M. E. (1995) Neutrophils and oral disease. *Dtsch Zahnarztl Z*, **50**, 278-286.
- Vodrážka, Z. (1992) *Biochemie 2*. Praha: Československá akademie věd.
- Volz, A. (1993) Regulation of CD18 expression in human neutrophils as related to shape changes. *Journal of Cell Science*, **106**, 493-501.
- Wang, P. L., Oido -Mori, M., Fujii, T., Kowashi, Y., Kikuchi, M. & Ohura, K. (2002) Effect of anti-CD14 antibody on experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Journal of Pharmacology*, **89**, 176-183.
- Wang, Z. M., Liu, C. & Dziarski, R. (2000) Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan and endotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 20260-20267.

- Wassenaar, A., Reinhardus, C., Thepen, T., Abraham-Inpijn, L. & Kievits, F. (1995) Cloning, characterization, and antigen specificity of T-lymphocyte subsets extracted from gingival tissue of chronic adult periodontitis patients. *Infect Immun*, **63**, 2147-2153.
- Wassenaar, A., Reinhardus, C., Abraham-Inpijn, L. & et.al. (1996) Type-1 and Type-2 CD8+ T-cell subsets isolated from chronic adult periodontitis tissue differ in surface phenotype and biological function. *Immunology*, **87**, 113-118.
- Watnabe, K. (1990) Prepubertal periodontitis: a review of diagnostic criteria, pathogenesis, and differential diagnosis. *J Periodont Res*, **25**, 31-48.
- Wu, T., Trevisan, M., Genco, R. J., Falkner, K. L., Dorn, J. P. & Sempos, C. T. (2000) Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and high density lipoprotein, cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. *Am J Epidemiol*, **151**, 273-282.
- Yamazaki, K., Nakajima, T., Aoyagi, T. & Hara, H. (1993) Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissue with periodontal disease. *J Periodont Res*, **28**, 324-334.
- Yamazaki, K., Nakajima, T., Gemmell, E., Polak, B., Seymour, G. J. & Hara, K. (1994) IL-4 and IL-6 producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med*, **23**, 347-353.
- Yamazaki, K., Nakajima, T., Ohsawa, Y., Tabeta, K., Yoshie, H., Sakurai, K. & Seymour, G. J. Selective expansion of T cells in gingival lesions of patients with chronic inflammatory periodontal disease. *Clin Exp Immunol* 120[1], 154-161. 2000.
- Yamazaki, K., Ohsawa, Y., Tabeta, K., Ito, H., Ueki, K., Oda, T., Yoshie, H. & Seymour, G. J. Accumulation of human heat shock protein 60 - reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infect Immun* 70[5], 2492-2501. 2002.
- Yamazaki, K. & Nakajima, T. (2004) Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontol* 2000, **34**, 75-100.
- Zambon, J. J. & Tempro, P. J. (1995) Immune responses to periodontal pathogens. *Dtsch Zahnarztl Z*, **5**, 357-360.
- Zambon, J. J., Grossi, S. G., Machtei, E. E., Ho, A. W., Dunford, R. & Genco, R. J. (1996) Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, **67**, 1050-1054.

Zhang, J., Dong, H., Kashket, S. & Duncan, M. J. (1999) IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases . *Microbial Pathogenesis*, **26**, 275-280.

Dodatky:

- Barua, P.K., Dyer, D.W. & Neiders, M.E. (1990) Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 5, 263 - 268.
- Civeira, F., Pocovi, M., Cenarro, A., Casao, E., Vilella, E. & Ordovas, J.M. (1996) Apo E variants in patients with type III hyperlipoproteinaemia. *Atherosclerosis* 127, 273- 282
- Consensus report *Americ. Acad. Periodontol* (1996) Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol*, 67, 935 -945
- Gunsolley, J.C., Califano, J.V., Koertge, T.E., Burmeister, J.A., Cooper, L.C. & Schenkein, H.A.(1995) Longitudinal assessment of early onset periodontitis. *J Periodontol*, 66, 321-8.
- Hagiwara, E., Gourley, M.F., Lee, S. & Klinman, D.K. (1996a) Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum.*, 39, 379-85.
- Janeway CA Jr (1988) Do suppressor T cells exist? A reply. *Scand J Immunol*. 27, 621-3.
- Link, J., Soderstrom, M., Olsson, T., Hojeborg, B., Ljungdahl, A. & Link H (1994) Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis. *Ann Neurol.*, 36, 379-86
- McGuirk,P. & Mills,K.H.G. (2002) Pathogen - specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infection diseases, *Trends Immunol*, 23,450 - 455
- McKee, A.S., McDermid, A.S., Baskerville, A., Dowsett, A.B., Ellwood, D.C. & Marsh, P.D. (1986) Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infect Immun.* 52, 349 - 355
- Mealey, B.L. & Rethman, M.P. (2003) Periodontal disease and diabetes mellitus. Bidirectional relationship. *Dent Today*. 22,107-13.
- Meyle, J. (2004) Leukocyte adhesion deficiency and prepubertal periodontitis. *Periodontol* 2000, 6, 26-36
- Pilon, M., Williams - Miller, C. & Cox, D. S. (1991) Interleukin -2 levels in gingival crevicular fluid in periodontitis. *J Dent Res*, 70, 550
- Seppala, B. & Ainamo J (1994) A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus, *J Clin Periodontol*, 21, 161 – 165
- Shlossman, M., Knowler, W.C., Pettitt, D.J. & Genco, R.J. (1990) Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. *J Am Dent Assoc.*, 121, 532-6.
- Soderstrom, M., Link, H., Fredrikson, S. & Sun JB (1994) Optic neuritis and multiple sclerosis: the T cell repertoires to myelin proteins and MBP peptides change with time. , 90, 10 - 18.
- Soskolne, W.A. & Klinger, A. (2001) The relationship between periodontal diseases and diabetes: an overview. *Ann Periodontol*, 6 ,91 – 98
- Tada, H, Sugawara, S, Nemoto, E, Imamura, T, Potempa, J, Travis, J, Shimauchi, H & Takada H.(2003) Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. *J Dent Res*, 82,796 -801
- Wang, C.H., Zhou, X., Zhou, G.D., Tan, X.D., Han, D.F., Zheng, F. & Liu F (2004) Genetic association of apoE and apoCI gene polymorphisms with coronary heart disease. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 25, 982-5
- Wang, C., Zhou,X., Ye, S., Han,D., Tan,X., Zheng,F. & Shi, Q.(2006) Combined effects of apoE-CI-CII cluster and LDL-R gene polymorphisms on chromosome 19 and coronary artery disease risk. *Int J Hyg Environ Health*, 2
- Zucchelli, G., Parente, R. & Melotti, C. (1991) Functional PMN defects in young periodontal patients. *Dent Cadmos*. 59, 48-56.
- Zadeh, H.H., Tanavoli, S., Haines, D.D. & Kreutzer, D.L. (2000) Despite large-scale T cell activation, only a minor subset of T cells responding in vitro to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* differentiate into effector T cells. *J Periodontal Res*, 35, 127-136