

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 infúze 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 infúze 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.