

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV PATOLOGICKÉ FYZIOLOGIE

ROLE GENETICKÝCH FAKTORŮ V ETIOPATOGENEZI
VYBRANÝCH ONEMOCNĚNÍ DUTINY ÚSTNÍ

Disertační práce v oboru fyziologie a patologická fyziologie

Školitel:

Prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D.

Autor:

Mgr. Petra Bořilová Linhartová

Brno, 2014

Abstrakt

Úvod. Genetické faktory hrají významnou roli v etiopatogenezi řady onemocnění dutiny ústní. Pro analýzu kandidátních lokusů jsme vybrali následující onemocnění: zubní kaz, parodontitidu u pacientů s/bez diabetu mellitu a zánětlivou zevní kořenovou resorpci (EARR) po ortodontické léčbě.

Metody. Disertační práce je koncipovaná jako komentovaný soubor 8 prací autorky (6 již zveřejněných prací a 2 článků v recenzním řízení) a 2 rukopisů připravovaných k odeslání. Kromě jednoho systematického review se jednalo o studie případů a zdravých kontrol (case-control study). Metodicky byla genetická analýza postavena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR).

Výsledky. Zatímco při studiu genetické determinace zubního kazu jsme neprokázali asociaci jenonukleotidového polymorfizmu (SNP) v genu pro laktoferin s rozvojem a/nebo závažností kazu, alela „2“ VNTR polymorfizmu v genu pro antagonistu interleukin-1 receptoru (IL-1RN) se ukázala riziková pro vznik EARR u dívek ($P=0,02$). Neprokázali jsme významnou asociaci alel, genotypů nebo haplotypů vybraných SNPs v IL-18 genu s chronickou parodontitidou (CP), stejně tak ani frekvence 2 SNPs v genu pro apolipoprotein E nebyly signifikantně odlišné mezi pacienty s CP a zdravými osobami. U pacientů s CP jsme však našli zvýšené hladiny lipoproteinu o nízké hustotě (LDL) a celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolními osobami ($P<0,05$). U pacientů s CP jsme dále pozorovali vliv IL-4 polymorfizmů na produkci některých cytokinů, např. interferonu- γ , IL-10, IL-1 α a IL-1 β , tumor nekrotizujícího faktoru- α a IL-6 po stimulaci heat shock proteinem 70 nebo vybranými parapatogeny (od $P<0,001$ k $P<0,05$). Některé haplotypy v genu pro IL-8 se ukázaly být protektivní proti rozvoji CP a současně určité SNPs v tomto genu ovlivňovaly výskyt konkrétních bakterií v subgingiválním sulku u zdravých kontrol ($P<0,01$) a v parodontálních chobotech u pacientů s agresivní parodontitidou (AgP, $P<0,02$) nebo u pacientů s CP ($P<0,05$). Při analýze polymorfizmů v IL-1 genovém klasteru jsme asociovali určité haplotypy s CP a diabetem mellitem 1. typu (T1DM) s/bez CP ($P<0,05$).

Závěr. Ačkoliv jsme prokázali vztah některých polymorfizmů v genech pro imunoregulační faktory k vybraným onemocněním dutiny ústní v české populaci, komplexní charakter těchto chorob vyžaduje další studium, ve kterém budou genetické analýzy kombinovány s mikrobiologickým, biochemickým, imunologickým i klinickým vyšetřením.

Klíčová slova

zubní kaz - kořenová resorpce - parodontitida - diabetes mellitus - studie kontrol-případů - genová variabilita - laktoferin - interleukiny - apolipoprotein E

Abstract

Background. Genetic factors play an important role in the etiopathogenesis of many diseases affecting the oral cavity. Genetic analysis of candidate loci was conducted in the most common oral diseases: dental caries, periodontitis in patients with/without diabetes mellitus and root resorption (EARR) after orthodontic treatment.

Methods. The thesis comprises a set of eight studies (six already published articles and two articles submitted for review) and two unpublished manuscripts prepared for submitting. With the exception of one systematic review, all articles were designed as case-control studies. Genetic analysis was based on the polymerase chain reaction principle (PCR).

Results. While the genetic determination of dental caries did not confirm a significant association between single nucleotide polymorphism (SNP) in the lactotransferrin gene and caries development and/or severity, allele 2 in interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) proved to be a risk for EARR in girls ($P=0.02$). No significant associations between alleles, genotypes or haplotypes of the selected SNPs in the IL-18 gene and chronic periodontitis were found; similarly frequencies of 2 SNPs in the apolipoprotein E gene did not differ significantly between patients with CP and controls. However, increased levels of low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol were measured in patients with CP vs. healthy controls ($P<0.05$). Further, the effects of IL-4 polymorphisms on production of some cytokines, e.g. interferon- γ , IL-10, IL-1 α and IL-1 β , tumor necrosis factor- α and IL-6 after stimulation with heat shock protein 70 or selected parapathogens (from $P<0.001$ to $P<0.05$) were observed in patients with CP. Some IL-8 haplotypes seem to be protective against the CP development and also some IL-8 SNPs affected the occurrence of specific bacteria in subgingival sulcus in the healthy controls ($P<0.01$), periodontal pockets in patients with aggressive periodontitis (AgP, $P<0.02$) or in patients with CP ($P<0.05$). Within the analysis of polymorphisms in the IL-1 gene cluster, some haplotypes were associated with CP and type 1 diabetes melitus (T1DM) with/without CP ($P<0.05$).

Conclusions. Although the relationship between some polymorphisms in the genes for immunoregulatory factors and selected diseases of the oral cavity in the Czech population was found, the complex nature of these diseases requires further study, combining genetic analyses and following clinical, microbiological and biochemical tests.

Keywords

dental caries - root resorption - periodontitis - diabetes mellitus - case-control study - gene variability - lactotransferrin - interleukins - apolipoprotein E

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. MUDr. Lydie Izakovičové Hollé, Ph.D. s využitím zdrojů uvedených v soupisu literatury.

.....
Mgr. Petra Bořilová Linhartová

Děkuji své školitelce Prof. MUDr. Lydii Izakovičové Hollé, Ph.D. za odborné vedení, za neocenitelnou pomoc při zpracování výsledků, sepsání odborných publikací a disertační práce. Velmi vděčná jsem také projektům Ministerstva zdravotnictví ČR (NT11405-6, NT11420-6, NS9775-4), Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (NPVII 2B06060) a Specifického výzkumu na Masarykově univerzitě (MUNI/A/0888/2012, MUNI/A/0951/2013) za finanční dotace poskytnuté pro účely výzkumné práce. Dále bych chtěla poděkovat manželovi a rodičům za podporu v průběhu celého studia a za trpělivost, kterou se mnou mají.

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle výzkumu.....	11
3. Zubní kaz - etiopatogeneze, kandidátní geny	12
3.1 Laktoferin - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	12
3.1.1 Komentář k publikaci „Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries“	13
4. Zevní apikální kořenová resorpce (EARR) - etiopatogeneze, kandidátní geny	22
4.1 Interleukin-1 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	23
4.1.1 Komentář k publikaci „IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia“	24
4.1.2 Interleukin-1 - metodika v publikaci „Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett’s esophagus“	36
5. A. Parodontitida - etiopatogeneze, kandidátní geny, popis zkoumaného souboru pacientů	47
5.1 Apolipoprotein E - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	56
5.1.1 Komentář k publikaci „Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria and lipid levels“	57
5.1.2 Apolipoprotein E - metodika v publikaci „Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD“	58
5.2 Interleukin-4 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	69
5.2.1 Komentář k publikaci „The effect of IL-4 polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and healthy controls“	69
5.3 Interleukin-8 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	72
5.3.1 Komentář k publikaci „Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis“	73
5.4 Interleukin-18 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu	84
5.4.1 Interleukin-18 - metodika, výsledky a diskuze.....	84

5.	B. Parodontitida a diabetes mellitus v publikaci „Diabetes mellitus a orální zdraví”	90
5.5	Interleukin-1- hladiny proteinu a významné genové polymorfizmy ve vztahu k parodontitidě a DM.....	93
5.5.1	Interleukin-1 - metodika, výsledky a diskuze.....	94
6.	Závěr.....	101
7.	Soupis literatury a pramenů.....	102
8.	Seznam zkratk.....	134
9.	Seznam obrázků.....	136
10.	Seznam tabulek.....	137
11.	Seznam příloh.....	138
12.	Seznam odborných publikací autora.....	139
	Publikace v časopisech s impakt faktorem (IF).....	139
	Publikace v časopisech bez IF.....	139
	Konferenční abstrakta.....	140
13.	Souhrn poznatků disertační práce.....	144
	Příloha 1 - Publikace „Interferon- γ +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria”	145
	Příloha 2 - Publikace „Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria and lipid levels”	152
	Příloha 3 - Publikace „The effect of IL-4 polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and healthy controls”.....	173
	Příloha 4 - Publikace „Diabetes mellitus a orální zdraví”	191

1. Úvod

Dutinu ústní lze pokládat za zrcadlo zdravotního stavu celého organismu. Problematika onemocnění dutiny ústní je velmi složitá, protože se v jejím rámci projevuje mnoho chorob různé etiologie i patogeneze. Nejčastěji bývá postižena zánětlivými infekčními nemocemi, kde infekční agens mohou být původu bakteriálního, mykotického, virového, nebo parazitárního, běžně se může jednat i o smíšený typ infekce.¹ S infekcemi v dutině ústní se setkáváme jak u celkově zdravých jedinců, tak i u pacientů s oslabenou imunitou, např. HIV/AIDS (oportunní infekce) nebo u pacientů se systémovými chorobami, jakými jsou diabetes mellitus (DM), ateroskleróza, ischemická choroba srdeční (příp. infarkt myokardu), gastroezofageální refluxní choroba (GERD) a další.² Šíření orální infekce probíhá prostřednictvím krevních a lymfatických cév v závislosti na virulenci dotyčných infekčních agens a stavu obranných mechanismů organismu. Následky primárně lokální infekce v dutině ústní tak mohou vést až k fatálním situacím, jakými jsou např. náhlá srdeční smrt či cévní mozková příhoda.³

Na vlastních obranných mechanismech v ústní dutině se velkou měrou podílí přirozená mikroflóra kompetující s potenciálními patogeny, a dále ve slinách přítomné antimikrobiální proteiny nespecifické imunitní odpovědi. Mezi ně se řadí například lysozym s baktericidními účinky, histatin a bakteriostatický laktoferin (LTF). Na obranných reakcích zprostředkovaných složkami specifické imunity participují T-lymfocyty a B-lymfocyty, resp. plazmatické buňky, které syntetizují v submukóze ústní sliznice imunoglobuliny (Ig), především pak IgA, schopné neutralizovat antigeny na slizničním povrchu.^{4(p311),5(p444)}

S mnoha zánětlivými procesy úzce souvisí přítomnost zubního plaku, adherujícího biofilmu mikroorganismů. Určité bakteriální druhy pak mohou být spojeny s konkrétním onemocněním. Například Gram negativní (G-) anaerobní bakterie dentálního plaku (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*) iniciují rozvoj zánětlivého onemocnění závěsného aparátu zubů nazývaného parodontitida.^{6,7}

Na patogenezi zubního kazu, který postihuje tvrdé zubní tkáně a je jednou z nejrozšířenějších infekčních chorob na světě^{8(p36)}, se významně podílejí kariogenní bakterie plaku. Nezanedbatelný význam v multifaktoriální etiologii vzniku/rozvoje zubního kazu má orální hygiena, stravovací návyky, expozice fluoridu a genetické predispozice, jejichž podíl se odhaduje na více než 50%.⁹ Několik geneticky podmíněných faktorů již bylo asociováno

se zvýšenou náchylností k tvorbě zubního kazu; mezi ně se řadí geny související s morfologií zubů a tvorbou skloviny, s dietními a chuťovými preferencemi, a v neposlední řadě se složením slin.¹⁰ Variabilita v genu pro slinami produkovaný glykoprotein LTF, byla ve vztahu k rozvoji zubního kazu již studována v brazilské populaci¹¹, ale dosud nebyla analyzována v kavkazské populaci.

Většímu riziku zubního kazu, ale i zánětlivému onemocnění parodontu a resorpci kořenů jsou vystaveni pacienti, kteří prodělali ortodontickou léčbu. Infekční příčinou těchto komplikací jsou bakterie plaku, proto je kontrola jeho množství a složení nezbytnou součástí prevence vzniku zmíněných onemocnění. Určité typy kořenových resorpcí jsou zánětlivým procesem, a proto v jejich patogenezi může hrát roli prozánětlivý mediátor interleukin-1 (IL-1) a jeho genové polymorfizmy. Studie dvojčat vedla k odhadu až 70% podílu dědičnosti na vzniku zevní apikální kořenové resorpce (EARR).¹²

Významná role genetických faktorů u parodontitidy, byla prokázána také studií na dvojčatech (tzv. „sib-pair“ model) již v roce 1994.¹³ Na základě patogenetické hypotézy byly v průběhu uplynulých let vybrány a analyzovány tzv. „kandidátní“ geny podílející se na náchylnosti, respektive rezistenci k rozvoji parodontitidy. K nim se řadí geny pro imunoregulační faktory (interleukiny, interferony, chemokiny, buněčné receptory a růstové faktory). Význam mohou mít i geny podílející se na kostní remodelaci, které ovlivňují architekturu kosti (receptor pro vitamín D, osteoprotegerin), geny pro proteolytické enzymy (matrixové metaloproteinázy) a další.¹⁴ K nalezení rizikových/protektivních polymorfizmů kandidátních genů jsou často využívány populační studie, ve kterých jsou porovnávány zdravé (kontrolní) osoby s pacienty postiženými daným onemocněním (tzv. case-control study).

Je známo, že onemocnění parodontu se častěji vyskytuje u některých systémových onemocnění, např. u pacientů s diabetem mellitem. Mezi parodontitidou a DM existuje reciproký vztah¹⁵, kdy těžké parodontitidy mohou nepříznivě ovlivnit kontrolu glykémie u pacientů s DM a přispět k rozvoji diabetických komplikací.¹⁶ Cytokiny uvolňované buňkami aktivovanými při zánětu mohou zahájit destrukci beta buněk pankreatu vedoucí ke vzniku DM 1. typu (T1DM) i přispět k rozvoji inzulínové rezistence u diabetiků 2. typu (T2DM).¹⁷ Na druhou stranu špatná kontrola glykémie u pacientů s DM je spojena se zvýšeným rizikem ztráty závěsného aparátu zubů a alveolární kosti, a tedy s rychlejším rozvojem a závažnější formou parodontitidy.^{18,19}

Disertační práce, která je koncipována jako komentovaný soubor 8 originálních prací autorky (6 již zveřejněných prací a 2 článků v recenzním řízení) a dále 2 rukopisů připravovaných

k odeslání, se zabývá genetickou analýzou vybraných kandidátních lokusů, které se mohou podílet na tvorbě zubního kazu, vzniku EARR po ortodontické léčbě a na rozvoji chronické či agresivní parodontitidy, příp. stupni postižení parodontálních tkání u pacientů s/bez DM.

2. Cíle výzkumu

Zubní kaz a parodontitida patří k nejčastějším chorobám v dnešní populaci a ukazuje se, že ačkoliv vyvolávajícím faktorem je přítomnost určitých bakterií v plaku, způsob, jakým organismus zareaguje na tuto situaci, je významně ovlivněn „genetickým pozadím“ organismu. Podíl genetických faktorů na vzniku zubního kazu i chronické parodontitidy je odhadován asi na 50 %, u agresivních forem je toto číslo ještě vyšší. Také zánětlivá zevní kořenová resorpce (EARR) má dosti výraznou genetickou komponentu. Náš hlavní zájem se dlouhodobě soustřeďoval na studium genetické variability zejména těch genů, jejichž produkty se podílejí na imunitních procesech v rámci zánětu. Výběr „kandidátních“ genů byl tedy orientován patogeneticky. Mezi studovanými lokusy dominovaly ty, které kódují cytokiny/interleukiny - konkrétně geny pro IL-1 α , β a IL-1R, IL-4, IL-8, IL-18, a dále geny pro apolipoprotein E a laktoferin.

Naše výzkumné cíle byly v souladu s výše uvedeným, tedy především:

- (i) Přispět k identifikaci rizikových (resp. protektivních) variant, event. jejich kombinací, které jsou podstatou genetické dispozice k rozvoji zubního kazu.
- (ii) Posoudit, zda se v české populaci uplatňuje rizikovost některých variant v IL-1 genovém klasteru dříve asociovaných s EARR v brazilské populaci při vzniku/rozvoji zánětlivé resorpce kořene po ortodontické léčbě.
- (iii) Přispět k identifikaci rizikových (resp. protektivních) variant, event. jejich kombinací, které jsou podstatou genetické dispozice k onemocnění parodontu u osob jinak celkově zdravých či s T1DM nebo T2DM.

3. Zubní kaz - etiopatogeneze, kandidátní geny

Zubní kaz je komplexní onemocnění multifaktoriální etiologie spojené s demineralizací zubní skloviny vedoucí ke ztrátě tvrdých zubních tkání. K demineralizaci dochází vlivem organických kyselin produkovaných kariogenními bakteriemi zubního plaku. Jedná se především o Gram pozitivní (G+) bakterie *Streptococcus mutans* a *Lactobacillus acidophilus*.^{20,21} Protože organické kyseliny vznikají z fermentabilních sacharidů přijímaných potravou, můžeme o zubním kazu mluvit jako o „infekční chorobě závislé na cukru“.^{22(p46)} Z patologicko-anatomického hlediska jde o nekrózu tvrdých zubních tkání bez zánětlivých příznaků.^{23(p94)}

V etiologii vzniku a rozvoje zubního kazu hrají významnou roli kromě mikrobiální flóry také hygienické a stravovací návyky, expozice fluoridu a výskyt některých systémových onemocnění.²⁴ Nicméně do skupiny proměnných je nutné zahrnout také genetickou variabilitu, jejíž podíl v etiopatogenezi tohoto onemocnění je v současné době odhadován na více než 50 %.⁹ V roce 2011 byla poprvé publikována celogenomová studie (tzv. genome-wide study) analyzující geny spojené s rizikem rozvoje zubního kazu, která naznačila, že jde o řadu lokusů, které mají většinou jen malý účinek, a teprve společně se podílejí na kariogenezi.²⁵

Jiným přístupem jsou studie kontroly-případy (tzv. case-control study). S náchylností k tvorbě zubního kazu bylo asociováno několik genů souvisejících s morfologií zubů a tvorbou skloviny, s dietními a chuťovými preferencemi a v neposlední řadě se složením slin.^{10,26} V kontextu zubního kazu byla zkoumána genetická variabilita také v obranných faktorech podílejících se na získané a vrozené imunitě organismu. Studie se zabývaly nejen variabilitou v genu pro bakteriostatický laktoferin¹¹, ale i v genech pro proteiny bohaté na prolin (proline-rich proteins, PRPs)^{27,28}, které ovlivňují adhezi *S. mutans* v dutině ústní a mohou tak mít protektivní funkci proti rozvoji zubního kazu.²⁹

3.1 Laktoferin - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Lidský laktoferin je glykoprotein vázající železo s antimikrobiální aktivitou produkovaný slinnými žlázami dutiny ústní.³⁰ Je významnou složkou vrozeného imunitního systému díky své schopnosti vychytávat dvě molekuly trojmocného železa (Fe^{3+}) z prostředí, čímž připravuje bakterie o tento důležitý prvek a inhibuje tak jejich růst.³¹

Gen pro LTF je lokalizován na chromozomu 3 v pozici 3p21 a je složen ze 17 exonů.³² Ve druhém exonu je přítomen jednonukleotidový polymorfismus (SNP) +140A/G

(rs1126478). Tento SNP představuje záměnovou mutaci (tranzici) adeninu (A) a guaninu (G) v pozici 140 báze v daném exonu genu pro LTF, která je v populaci zastoupena ve více než 1 %. Význam polymorfizmu spočívá ve změně aminokyselinové sekvence výsledného proteinu LTF v pozici 47 N-konce, nebo v pozici 29, pokud není do počítání zahrnut signální peptid. Substituce A za G odpovídá změně varianty obsahující arginin (Arg, kódovaný tripletem AGA) na variantu s lysinem (Lys, kódovaný tripletem AAA), která má významně vyšší antibakteriální aktivitu proti G+ bakteriím než varianta proteinu LTF s Arg.³³

3.1.1 Komentář k publikaci „Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries“

V roce 2014 byl v časopisu Caries Research publikován originální článek s názvem „Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries“, na kterém jsme s MUDr. Michaelou Bartošovou (rozenou Volčkovou) ze Stomatologické kliniky, Fakultní nemocnice u svaté Anny (FNUSA) v Brně, uvedeny jako první autorky.³⁴ Publikovaný článek je součástí této kapitoly.

Práce vznikla na základě hypotézy, že funkční polymorfismus v genu pro LTF (rs1126478) může modifikovat relativní riziko rozvoje zubního kazu. Do té doby byla publikována pouze jedna studie analyzující alelické a genotypové frekvence daného LTF polymorfizmu u pacientů se zubním kazem, která asociovala alelu 2 (není uvedeno, zda se jedná o variantu s A nebo s G) s náchylností ke vzniku kazu u 12 letých dětí v brazilské populaci.¹¹ Cílem naší práce bylo porovnat distribuci alel a genotypů LTF (rs1126478) ve skupině českých dětí se zubním kazem vs. bez kazu, a dále zjistit, zda daná varianta LTF genu může být asociována se závažností onemocnění (definované indexem kazivosti chrupu, KPE) v podskupinách dětí postižených zubním kazem.

Ze souboru brněnské studie ELSPAC (Evropská longitudiální studie těhotenství a dětství), která zahrnuje více než 5000 dětí a jejich rodin, bylo vybráno 637 nepříbuzných dětí, z toho 323 chlapců a 314 dívek, ve věku 11 až 13 let. Zkoumali jsme skupinu kontrolních dětí bez kazu (KPE=0) a porovnávali ji se skupinou pacientů s kazem (KPE≥1). Klinické vyšetření pacientů a odběry bukálních stěrů u pacientů byly prováděny na Stomatologické klinice, Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a FNUSA v Brně.

Ze získaných vzorků buněk bukální sliznice jsme v laboratořích Ústavu patologické fyziologie LF MU v Brně extrahovali deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) za použití izolačního kitu UltraClean[®] BloodSpin[®] DNA Isolation Kit (Mo bio Laboratories, Inc,

Carlsbad, CA, USA). Vybraný úsek DNA obsahující daný SNP (rs1126478) v genu pro LTF jsme amplifikovali pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro určení výsledného genotypu jsme využili restriční analýzy (RA), při které jsme amplifikovaný úsek inkubovali s restričním enzymem *EaeI* (Biolabs New England, Hitchin, UK) schopným rozpoznat a rozštěpit specifickou nukleotidovou sekvencí. Vizualizaci fragmentů pod ultrafialovým (UV) světlem a odečtení genotypů jsme provedli s využitím elektroforetické separace DNA fragmentů na agarózovém gelu obsahujícím interkalační barvivo.

Při statistickém hodnocení výsledků jsme porovnávali alelické a genotypové frekvence mezi kontrolními osobami a dětmi postiženými zubním kazem. Rozdíly v alelických frekvencích mezi oběma skupinami jsme počítali pomocí Fisherova exaktního testu. Pro testování genotypových odchylek od Hardy-Weinbergovy rovnováhy a pro porovnání rozdílů v genotypech mezi danými skupinami jsme využili Pearsonova χ^2 -testu. Hladinu významnosti (P) jsme stanovili jako menší než 0,05. Poměr šancí (OR), 95% interval spolehlivosti (CI) a signifikantní hodnoty významnosti rozdílů byly počítány s využitím statistického programu Statistica v. 10.0 (StatSoft Inc, Tulsa, USA). Výpočet síly testu (tzv. „power analýzu“) jsme provedli pomocí SPSS software (SPSS 20.0.1, IBM Corporation, 2011).

Z 637 osob, které byly do této studie zařazeny, bylo 155 dětí (24,3 %) bez zubního kazu a 482 (75,6 %) dětí postižených zubním kazem, z toho 103 (21,4 %) s nízkým (KPE=1), 158 (32,8 %) se středním ($2 \leq \text{KPE} \leq 3$) a 221 (45,6 %) s vysokým ($\text{KPE} \geq 4$) indexem kazivosti chrupu. Skupina dětí bez zubního kazu byla v Hardy-Weinbergově rovnováze s nevýznamnými χ^2 hodnotami po srovnání pozorovaných a očekávaných genotypových frekvencí zkoumané LTF varianty. V celé kohortě jsme nenalezli významné rozdíly mezi výskytem zubního kazu a alelickými nebo genotypovými frekvencemi LFT +140A/G. Tyto byly podobné i ve všech třech podskupinách pacientů s různou závažností zubního kazu. Ačkoli jsme neprokázali rozdíly mezi pohlavím, v různých věkových skupinách, gingiválních indexech (GI) a indexu zubního kamene (CSI) mezi případy a kontrolami ($P > 0,05$), KPE a plak-index (PI) byly signifikantně vyšší u dětí se zubním kazem oproti kontrolám ($P < 0,05$).

V této studii jsme hodnotili LTF +140A/G (rs1126478) variantu u poměrně velké skupiny (N=637) dětí s kazem a bez kazu. Genotypové frekvence tohoto polymorfizmu v české populaci byly v rozmezí zaznamenaném u jiných evropských kohort s frekvencí alely A cca 0,60 až 0,75.³⁵ Naše data, která neprokázala rozdíl ve frekvencích alel a genotypů u polymorfizmu LTF +140A/G varianty u dětí s a bez kazu, nebo s různou závažností zubního kazu nejsou v souladu s dříve publikovanými závěry studie od Azevedo et al., která popsala,

že častěji zastoupená alela 1 (není uvedeno, zda se jedná o variantu s A nebo s G) je protektivní proti rozvoji zubního kazu v brazilské populaci.¹¹ Diskrepance v alelických frekvencích mezi populacemi je častá a může být jedním z faktorů odlišnosti výsledků mezi českou a brazilskou studií. Na rozdíl od evropské populace je totiž v asijské a afroamerické populaci frekvence dominantní G alely uváděna v rozmezí 0,7 až 0,9.³³ Neopomenutelná je také diference v metodickém přístupu a ve velikosti zkoumaného vzorku mezi naší a brazilskou studií. Zatímco Azevedo et al. použili pro genetickou analýzu metodiku PCR jednovláknového konformačního polymorfizmu (SSCP), v naší studii byla použita PCR s následnou restrikční analýzou. Velikost zkoumané brazilské skupiny byla pouze 110 osob, z toho 48 kontrol a 62 dětí se zubním kazem, oproti české kohortě o velikosti 637 dětí.¹¹

Varianta v genu pro LTF (rs1126478), která kóduje Arg v aminokyselinové sekvenci proteinu, má slabší/nížší antibakteriální účinek na G+ bakterie u pacientů s lokalizovanou juvenilní parodontitidou.³³ Mimo to je také přítomnost alely G spojena s vyšší koncentrací LTF v krevní plazmě u evropské populace.³⁶ V orální mikroflóře osob nesoucích alespoň jednu alelu kódující Lys v LTF proteinu, která má vyšší antimikrobiální aktivitu proti G+ bakteriím, byla nalezena nižší koncentrace *S. mutans*.³³

Limitace naší studie spočívá v etiopatogenetickém základu tohoto multifaktoriálního onemocnění, kdy genetické predispozice jsou jen jednou z příčin vedoucích k rozvoji zubního kazu. V naší studii jsme navíc sledovali pouze jeden polymorfizmus v genu pro LTF a nevěnovali jsme pozornost jiným kandidátním genům a jejich variantám, které by mohly mít vliv na vznik zubního kazu. Další limitací byl design studie kontroly-případy, který může vykazovat falešně pozitivní výsledky, zvláště pokud se jedná o nesourodou kohortu zkoumaných subjektů. Tomu jsme se ale snažili předejít tím, že děti byly vybrány z homogenního souboru ELSPAC. Současně byl počet dětí zařazených do studie téměř šestkrát větší než v práci od Azevedo et al.¹¹, čímž bylo sníženo riziko falešně negativních závěrů. Bohužel jsme neměli k dispozici údaje o výši hladin cirkulujícího LTF proteinu nebo o expresi jeho genu, proto nejsme schopni posoudit funkční konsekvence daného polymorfizmu u zkoumaných dětí.

Protože se, na rozdíl od brazilské populace, u českých dětí nepodařilo prokázat asociaci polymorfizmu LTF +140A/G se vznikem ani závažností zubního kazu, nemůžeme SNP rs1126478 považovat za rizikový faktor tohoto onemocnění. K pochopení problematiky zubního kazu na molekulární úrovni bude zapotřebí dalších výzkumů, a to jak na úrovni jiných genů, tak i na odlišných populacích.

4. Zevní apikální kořenová resorpce (EARR) - etiopatogeneze, kandidátní geny

Resorpce kořene představuje ztrátu zubních tkání (tj. cementu a dentinu) v důsledku aktivace odontoklastů. Základní rozdělení kořenových resorpcí je dle anatomického postižení - tj. vnitřní a zevní resorpce kořene. Doplnková klasifikace zahrnuje 2 typy vnitřní resorpce: „nahrazovací“ resorpci (resorpci náhradou kostní tkáně) a „zánětlivou“ resorpci. Zevní resorpce se rozděluje do 4 podkategorií na základě klinických a histologických nálezů: zevní povrchová resorpce, zevní zánětlivá kořenová resorpce, resorpce náhradou kostní tkáně a ankylóza. Zevní zánětlivou kořenovou resorpci můžeme dále dělit na krčkovou (cervikální) resorpci bez nebo s postižením pulpy (invazivní cervikální kořenová resorpce) a zevní apikální kořenovou resorpci (EARR).³⁷ EARR tedy označuje patologický proces projevující se ireverzibilním zkrácením apexu kořene zubu.

Externí resorpce vycházejí z vnějšího povrchu kořene zubu ze strany periodontia a jsou podmíněny aktivitou odontoklastů a/nebo osteoklastů, které demineralizují kalcifikovaný povrch kořene, enzymaticky jej rozpouštějí a fagocytují uvolněné částičky. Následkem těchto dějů vznikají resorpční lakuny, které mohou být při zánětlivých onemocněních parodontu osídleny bakteriemi, jejichž přítomnost přispívá k recidivám kořenové resorpce.

Nejčastěji se EARR objevuje v návaznosti na předchozí trauma a v reakci na periapikální a parodontální záněty.³⁸ Často jde také o nežádoucí iatrogenní komplikaci léčby ortodontickým aparátem postihující především horní řezáky.^{39,40} Za jednu z možných příčin je běžně považována aplikace příliš velkých mechanických sil na kořen zubu, nicméně se EARR vyskytuje také u 7 až 13 % jedinců, kteří ortodontickou léčbu nepodstoupili.^{41,42,43}

V případě EARR se předpokládá multifaktoriální etiopatogeneze, kdy se na jejím vzniku a progresi podílejí kombinace působení biologických a mechanických vlivů, konkrétně pak lze hovořit o individuální citlivosti, genetické variabilitě a systémových onemocněních. Podstatný je i typ ortodontického pohybu, délka trvání léčby atd.^{44,45,46,47} Řada faktorů, jakými jsou etnický původ, věk, pohlaví, typ skusu a tvar kořene, byla již asociována s kořenovou resorpcí.^{40,44,48} V roce 1975 Newman popsal familiární výskyt EARR.⁴⁹ Harris et al. poté v roce 1997 publikovali hypotézu o možném genetickém podílu u EARR a s využitím „modelu sourozenců“ stanovili heritabilitu tohoto stavu na cca 70 %.⁵⁰

Při studiu dědičných rizikových faktorů analyzovaných v souvislosti s kořenovou resorpcí je pozornost soustředěna zejména na kandidátní geny, jejichž produkty kontrolují kostní

remodelaci, což se odvíjí od etiopatogenetické podstaty EARR. Předpokládá se význam regulačních proteinů řídících aktivaci osteoklastů (aktivátor receptoru nukleárního faktoru κ B/ligand aktivátoru receptoru nukleárního faktoru κ B/osteoprotegerin neboli RANK/RANKL/OPG) nebo modulaci zánětlivé reakce (adenozintrifosfát/purinergní receptor P2X7/interleukin-1 β neboli ATP/P2X7R/IL-1 β).^{51,52,53}

Retrospektivní studie od Pereira et al. se snažila o vytvoření multifaktoriálního integračního modelu pro analýzu rizika rozvoje postortodontické EARR zahrnujícího 9 klinických faktorů a 4 SNPs účastnících se remodelace kosti a zubního kořene. Mezi proměnné, které měly v tomto modelu nejvýznamnější vliv, se zařadily pohlaví (P<0,05), délka trvání léčby (P<0,001), extrakce premolárů (P<0,01), použití Hyrax aparátu (P<0,001) a výskyt GG genotypu u SNP rs1718119 v P2X7R genu (P<0,01).⁵⁴ Přitom P2X7R gen není jen významným regulátorem remodelace kosti, ale je rovněž schopen stimulovat zánětlivou odpověď uvolňováním prozánětlivých cytokinů, jako je např. IL-1 β , buňkami imunitního systému.⁵⁵

V posledních deseti letech několik dalších výzkumných skupin studovalo genetické predispozice ke vzniku EARR.^{40,53,56,57,58,59,60,61,62} Meta-analýza od Wu et al., která porovnávala výsledky 7 prací zaměřených na problematiku variability v genu pro IL-1, zejména pak SNP IL-1B (rs1143634), kdy v nukleotidové sekvenci dochází k záměně bází cytosinu (C) a thyminu (T) v pozici +3953 (+3953C/T), u pacientů s EARR po ortodontické léčbě, odkazuje na důležitost dalšího studia polymorfizmů v IL-1 genovém klasteru.⁶³

4.1 Interleukin-1 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Interleukin-1 (IL-1) je pluripotentní cytokin uvolňovaný převážně monocyty, makrofágy a dendritickými buňkami. Patří k hlavním mediátorům zánětlivého procesu, kde prozánětlivou aktivitu vykazují jeho dvě formy, IL-1 α a IL-1 β , v kontrastu s protizánětlivými schopnostmi antagonisty IL-1 receptoru (IL-1RA).⁶⁴ Současně je IL-1 schopen stimulovat diferenciaci osteoklastů, což může ovlivnit vznik/rozvoj výše zmíněné kořenové resorpce.⁶⁵ Tomu odpovídá i nález vyšších koncentrací IL-1 β v sulkulární tekutině (GCF) a gingivální tkáni u pacientů podstupujících ortodontickou léčbu.^{66,67,68}

Proteiny IL-1 α , IL-1 β a IL-1RA jsou kódovány geny IL-1A, IL-1B a IL-1RN, které jsou součástí IL-1 klastru o velikosti 430 kb lokalizovaného na chromozomu 2q14-q21.⁶⁹ Polymorfizmy v těchto genech mohou přispět ke změnám v produkci cytokinů, proto jsou intenzivně zkoumány v korelaci s hladinami daných mediátorů a s patogenezí různých

zánětlivých chorob. Dominici et al. uvádějí, že TT genotyp u SNP -889C/T (rs1800587) v IL-1A genu signifikantně zvyšuje jeho transkripční aktivitu, koncentraci IL-1 α mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) a hladiny proteinu v krevní plazmě.⁷⁰ Také alela T u IL-1B +3953C/T (rs1143634) SNP, nyní popisovaná jako IL-1B +3954C/T, je asociována se zvýšenou produkcí IL-1 β .⁷¹ Polymorfismus variabilního počtu tandemových repetitivních (VNTR) ve 2. intronu IL-1RN genu existuje v šesti alelických variantách odpovídajících jedné až šesti kopiím 86 bp dlouhé repetitivní sekvence, kdy alela se 4 opakujícími se kopiemi (IL-1RN*1, 412 bp) a alela se 2 kopiemi (IL-1RN*2, 240 bp) jsou v populaci zastoupeny nejčastěji, zatímco jiné typy alel se vyskytují ve frekvenci menší než 5%.⁷² IL-1RN*2 varianta je také označovaná jako krátká (short allele, IL-1RN*S), kdežto ostatní typy alel s více než 2 repetitivními, IL-1RN*1, IL-1RN*3 (5 repetitivních, 498 bp), IL-1RN*4 (3 repetitivních, 326 bp) a IL-1RN*5 (6 repetitivních, 584 bp), byly zařazeny do skupiny dlouhých alel (long allele, IL-1RN*L).⁷³ Jako IL-1RN*6 alela je popsána ta, která má pouze 1 opakování (154 bp). Vamvakopoulos et al. zjistili, že IL-1RN*1 homozygoti měli 3,5krát vyšší plazmatickou koncentraci IL-1 β než nositelé alespoň jedné IL-1RN*2 alely, a naopak plazmatické hladiny IL-1RA byly nižší u IL-1RN*1 homozygotů ve srovnání s IL-1RN*2 homozygoty.⁷² Výsledky této práce korelují s dřívějšími studiemi, kdy byla přítomnost IL-1RN*2 alely asociována se zvýšenou produkcí IL-1RA *in vitro*.⁷⁴ Konfliktních výsledků bylo dosaženo při studiu vlivu tohoto VNTR polymorfismu u zdravých dárců krve, kdy alela IL-1RN*2, případně genotyp IL-1RN*2/2, byly asociovány se zvýšením ale i se snížením sekrece IL-1RA.⁷⁵ Kromě toho bylo několik jiných běžných variant v IL-1RN genu silně spojeno se sérovými hladinami IL-1RA⁷⁶, což může vysvětlit rozdílné výsledky jednotlivých studií získaných analýzou pouze jedné zkoumané varianty.

4.1.1 Komentář k publikaci „IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia“

V roce 2013 byla v časopisu *Oral Diseases* publikována naše původní práce s názvem „IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia“, která je součástí této kapitoly.⁷⁷ Dosud byla tato publikace citovaná 3 autory.^{54,63,78}

Cílem našeho výzkumu bylo analyzovat polymorfni oblasti v IL-1 genu u českých pacientů s EARR. Pro haplotypovou analýzu jsme zvolili dva jednonukleotidové polymorfizmy, jeden v promotorové oblasti IL-1A -889C/T (rs1800587) a druhý v 5. exonu IL-1B +3953C/T

(rs1143634), a dále tandemovou repetici o délce 86 párů bazí ve 2. intronu genu pro IL-1RN. Získání DNA ze vzorků a genotypizace pacientů proběhla dle postupů obsažených v naší dříve uveřejněné práci uvedené v **kapitole 4.1.2**, ve které jsme analyzovali haplotyp v IL-1 genovém klasteru u pacientů s GERD.⁷⁹

Metodicky se jednalo o studii kontrol-případů, která zahrnovala 32 pacientů s EARR ve věku 15,0±4,1 let a 74 kontrolních osob ve věku 15,2±5,3 let bez resorpce v retenční fázi po ortodontické léčbě. Pacienti byli vyšetřeni na Ortodontickém oddělení Stomatologické kliniky FNUSA v Brně, paní doc. MUDr. Pavlínou Černochovou, Ph.D. v rozmezí let 2005 až 2010. Všichni pacienti museli splňovat kritéria zahrnující dostupnost úplných anamnestických a klinických údajů, průkazné rentgenové snímky (orthopantomogramy a laterální cefalogramy + intraorální snímky) pořízené před a po léčbě pomocí stejného přístroje. Ze studie byli vyloučeni pacienti, kteří měli poranění zubů, prodělali endodontickou nebo dřívější ortodontickou léčbu fixním aparátem, nebo ti, kteří trpěli systémovou chorobou postihující tvrdé tkáně.

Pro měření délky korunky a kořene na rentgenových snímcích byly zvoleny horní řezáky, které jsou nejcitlivější na vznik kořenové resorpce.^{80,81,82} Postup měření je podrobněji popsán v příložené publikaci k této kapitole.⁷⁷ Rozdělení pacientů do dvou skupin proběhlo dle studií od Al-Qawasmi et al. na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti postortodontické EARR, kdy u kontrolní skupiny byla resorpce menší než 2 mm, zatímco u skupiny pacientů s EARR dosahovala resorpce více než 2 mm.^{56,57} Chyba měření byla vypočtena z Dahlbergova vzorce ($S = \sqrt{\Sigma d^2 / 2n}$), kde d je rozdíl mezi opakovanými měřeními a n je počet párových opakovaných měření.⁸³ U pacientů byly dále vedeny záznamy o pohlaví, Angleově třídě, věku, kdy byl použit fixační ortodontický aparát, délce trvání aktivní léčby a údaj o tom, zda bylo nutné při léčbě přistoupit k extrakci.

Při analýze byly použity metody standardní popisné statistiky, pro kategorické proměnné byly počítány absolutní a relativní frekvence, zatímco pro spojitě proměnné byly počítány průměr a směrodatné odchylky. Srovnání alelických a genotypových frekvencí proběhlo mezi skupinou zdravých kontrol a souborem pacientů s EARR. Rozdíly v alelických frekvencích byly testovány Fisherovým exaktním testem a Hardy-Weinbergova rovnováha a rozdíly v genotypových frekvencích mezi skupinami byly počítány χ^2 testem. Hranice statistické významnosti byla stanovena na $P < 0,05$.

Pomocí programu PHASE 2.1 jsme stanovili haplotypové frekvence; rozdíly v distribuci jednotlivých haplotypů byly následně vyhodnoceny permutačním testem. Pro haplotypovou

analýzu byly IL-1RN genotypy rozděleny do dvou skupin dle typu alel na IL-1RN*S nebo IL-1RN*L, viz **kapitola 4.1.**⁷³ Asociace mezi IL-1 polymorfizmy a klinickými parametry byla hodnocena pomocí logistických regresních modelů vyjadřujících jak jednorozměrný odhad míry pravděpodobnosti (OR včetně 95%CI), tak i multivariační OR upravené podle věku, pohlaví, Angleovy klasifikace a typu léčby. Statistické analýzy byly prováděny pomocí programů SPSS 20.0.0 (IBM Corporation, 2011) a Statistica v. 10.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Neprokázali jsme statisticky významné rozdíly v alelických ani genotypových frekvencích všech tří zkoumaných polymorfizmů mezi kontrolními dětmi a pacienty s EARR po ortodontické léčbě. Podrobnější analýza provedená odděleně ve skupinách chlapců (N=40) a dívek (N=66) ale ukázala významný rozdíl ve frekvenci alel IL-1RN VNTR varianty u dívek, neboť IL-1RN*2 alela byla častější u pacientek s EARR než u zdravých kontrol (42,5 % vs. 22,8 %, P=0,02, OR=2,50, 95%CI=1,13-5,53). Navíc u dívek, homozygoti a heterozygoti nesoucí tuto krátkou alelu měli výrazně vyšší riziko vzniku EARR (P=0,02), zatímco v případě IL-1RNLL genotypu se toto riziko snížilo (P=0,04). U chlapců jsme žádné rozdíly při porovnání genotypů nebo alel mezi případy s EARR a kontrolami nezaznamenali (P>0,05).

Také při haplotypové analýze, kdy jsme našli 8 různých haplotypů, jsme neprokázali významné rozdíly mezi skupinami, a to ani po rozdělení pacientů dle pohlaví. Nicméně u dívek s EARR se haplotyp s T alelami u IL-1A -889C/T a IL-1B +3953C/T v kombinaci s IL-1RN*2 alelou vyskytoval častěji (13,1 % vs. 3,9 %) a haplotypy s T alelami u IL-1A -889C/T a IL-1B +3953C/T v kombinaci s IL-1RN*L alelou méně často než u kontrolní skupiny pacientek (6,9 % vs. 23,0 %).

V této studii jsme věnovali pozornost členům IL-1 genové rodiny, které patří k centrálním regulátorům imunitních mechanismů a mohou mít vliv na intenzitu zánětlivé reakce, a tak se podílet na vzniku kořenových resorpcí. Pokud je nám známo, jde o první haplotypovou analýzu IL-1 genových variant u pacientů s EARR, která popsala asociaci mezi IL-1RN*2 krátkou alelou 86 bp VNTR v intronu 2 a vznikem EARR po ortodontické léčbě u dívek.

Ačkoli už byla publikována řada asociačních studií zmiňovaných polymorfizmů, především v IL-1A a IL-1B genech v různých populacích, jednalo se většinou o analýzy jednotlivých variant a ne o haplotypové studie. IL-1A -889TT genotyp a IL-1B +3953CC genotyp i samotná C alela tohoto SNP byly označeny za rizikový faktor vzniku EARR.^{57,59,61,62} Naše data nicméně nepotvrdila tvrzení o asociaci IL-1A -889C/T (rs1800587) a IL-1B +3953C/T

(rs1143634) genových polymorfizmů s EARR. Na diskrepanci výsledků mezi studii se může podílet genetická heterogenita této komplexní choroby, dále pak etnická příslušnost zkoumaných osob v různých studiích, případně vazebná nerovnováha mezi jednotlivými polymorfizmy.

Inglesias-Linares et al. se ve své práci zabývali i SNP IL-1RN +2018C/T (rs419598) ve 2. exonu, který je v kompletní vazbě s námi zkoumaným IL-1RN 86 bp VNTR polymorfizmem, a podařilo se jim najít asociaci TT genotypu s rizikem vzniku EARR.⁶² Dosáhli jsme tedy podobných výsledků, i když ne tak výrazné significance, jako kolegové ve studii na španělské populaci.

V české populaci vykazuje alela IL-1RN*2 v homozygotní nebo heterozygotní formě významně zvýšené riziko vzniku EARR u dívek. Některé dřívější výzkumy sice popisují vyšší výskyt EARR u ortodonticky léčených žen ve srovnání s muži⁸⁴, ale na druhou stranu existují i práce, které žádné rozdíly v incidenci/prevalenci onemocnění v závislosti na pohlaví nezjistily.^{85,86} Alela IL-1RN*1 byla častěji pozorována u mužů, zatímco alela IL-1RN*2 se vyskytovala spíše u žen⁸⁷, což je v souladu s našimi zjištěními. Domníváme se, že rozdíl mezi pohlavími ve frekvenci IL-1RN genového polymorfizmu může mít vliv na výši IL-1 a IL-1RA hladin a může být jednou z příčin rozdílů mezi pohlavími v imunitní odpovědi pozorované i u jiných onemocnění, jako je revmatoidní artritida⁸⁸ a DM⁸⁹, nebo v naší studii pozorovaného vyššího výskytu EARR u dívek.

Potvrdili jsme tedy hypotézu o možném vlivu IL-1RN genové variability na vznik EARR po ortodontické léčbě, a to především u dívek v české populaci. Aby mohl být IL-1RN polymorfizmus označen za rizikový faktor pro rozvoj kořenové resorpce, je třeba dalších studií na odlišných populacích.

4.1.2 Interleukin-1 - metodika v publikaci „Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett’s esophagus“

V roce 2013 byla v časopisu *Human Immunology* uveřejněna originální práce našeho kolektivu pod názvem „Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barrett’s esophagus“, článek je v kapitole uvedený pod komentářem.⁷⁹ Na této práci, především pak na metodické části týkající se genotypizací, jsem se spoluautorsky podílela.

Gastroezofageální refluxní chroba je definována jako selhání antirefluxní bariéry umožňující abnormální reflux obsahu žaludku do jícnu. Jde o běžnou poruchu, kdy 14 až 24 % dospělé západní populace má příznaky GERD (pálení žáhy, kyselé říhání) alespoň jednou týdně a 4 až 9 % populace jimi trpí dokonce denně.^{90,91} Přibližně u 50 % pacientů s GERD se rozvine refluxní ezofagitida (RE), v některých případech až Barrettův jícen (BE), který může přejít v adenokarcinom jícnu (EAC).⁹² Na základě studií na monozygotních a dizygotních dvojčatech s GERD byl prokázán vliv genetických faktorů na rozvoj refluxu.^{93,94} Jedná se o multifaktoriální chorobu, v jejíž etiopatogenezi se kromě genetických faktorů uplatňují i vlivy zevního prostředí.^{95,96,97,98}

Ve studiích, které se zabývaly orálním zdravím pacientů s GERD, byl reflux označen za rizikový faktor vzniku chronické parodontitidy.⁹⁹ Filipi et al. pozorovali nižší salivaci a pufrací kapacitu slin u pacientů s GERD, která může být asociována se zvýšeným rizikem vzniku zubního kazu a erozemi skloviny.¹⁰⁰ Nicméně studium orálního zdraví u pacientů s GERD nebylo předmětem tohoto výzkumu. Publikace je do disertační práce zařazena kvůli metodice navržené pro genotypizaci IL-1 genového klasteru, která byla použita při studiu EARR po ortodontické léčbě (**kapitola 4.1.1**)⁷⁷ a u pacientů s chronickou parodontitidou s/bez DM (**kapitola 5.5.1**).

DNA vzorky jsme získali z leukocytů periferní krve, poté jsme analyzovali genovou variabilitu v IL-1A -889C/T (rs1800587), IL-1B +3953C/T (rs1143634) a IL-1RN 86 bp VNTR v intronu 2. Pro IL-1A a IL-1B SNPs jsme k amplifikaci vybraného úseku genu využili PCR a následné RA. Metodika IL-1A -889C/T (rs1800587) byla zavedena dle předchozí publikace od McDowell et al. s drobnými úpravami pro naše podmínky.¹⁰¹ Pro RA jsme využili restriční endonukleázu *NcoI* (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom), se kterou jsme amplikon inkubovali při teplotě 37°C přibližně 12 hodin. V případě SNP IL-1B +3953C/T (rs1143634) jsme postupovali dle metodiky uvedené v práci Kornman et al., kterou jsme mírně modifikovali.¹⁰² Restriční endonukleáza byla zvolena dle protokolu,

a to *TaqI* (New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom), která k rozštěpení cílové sekvence vyžaduje inkubaci 4 hodiny při teplotě 65°C. Užitím interkalačního barviva (ethidium bromid), které bylo součástí 3% agarózového gelu, jsme po elektroforetické separaci naštěpených amplikonů a následném ozáření gelu UV světlem o vlnové délce 590 nm dosáhli vizualizace DNA fragmentů. U obou SNPs varianta s bazí T způsobila, že sekvence ji obsahující nebyla restriktaázou rozpoznána a rozštěpena. Opačný případ nastal v případě genové varianty s bazí C. Genotypy byly popsány u IL-1A -889C/T (rs1800587) jako CC (83+16 bp), CT (99+83+16 bp) a TT (99 bp), a u IL-1B +3953C/T (rs1143634) CC (12+85+97 bp), CT (12+85+97+182 bp) a TT (12+182 bp).

V metodice genotypizace IL-1RN 86 bp VNTR v intronu 2 jsme se řídili postupem popsaným v práci od Tarlow et al.¹⁰³ Princip metody je také založen na PCR, není ale nutné restrikční štěpení. Různý počet tandemových repetitivních sekvencí lze po vizualizaci popsané výše identifikovat dle velikostí fragmentů, které se od sebe budou lišit vždy o 86 bp, tzn., jedná se o násobky délky jedné repetitivní sekvence. Označení alel u IL-1RN VNTR polymorfizmu je uvedeno **v kapitole 4.1.**⁷³

5. A. Parodontitida - etiopatogeneze, kandidátní geny, popis zkoumaného souboru pacientů

Parodontitida je multifaktoriální onemocnění, charakterizované zánětem, resorpcí alveolární kosti, degenerací zubního cementu a periodontálních vazů, což v konečném důsledku u neléčených forem může vést až ke ztrátě postižených zubů. V souvislosti s parodontitidou se zvažuje míra negativního vlivu endotoxinů produkovaných parodontálními patogeny a případné bakteriémie u postižených pacientů na celkový zdravotní stav jedince. Problematice onemocnění parodontu a jejího vztahu k systémovým chorobám se věnuje stále více studií.^{2,104} Byly již zkoumány vztahy mezi parodontitidou a kardiovaskulárním onemocněním¹⁰⁵, aterosklerózou¹⁰⁶, endoteliální dysfunkcí¹⁰⁷, glukózovou intolerancí¹⁰⁸, metabolickým syndromem^{109,110}, plicními chorobami^{111,112} a předčasným porodem.¹¹³ Výskyt celkových onemocnění může na druhou stranu znamenat i zvýšené riziko rozvoje parodontitidy, což bylo pozorováno např. u pacientů s diabetem, imunodeficiencí (HIV) apod.¹¹⁴

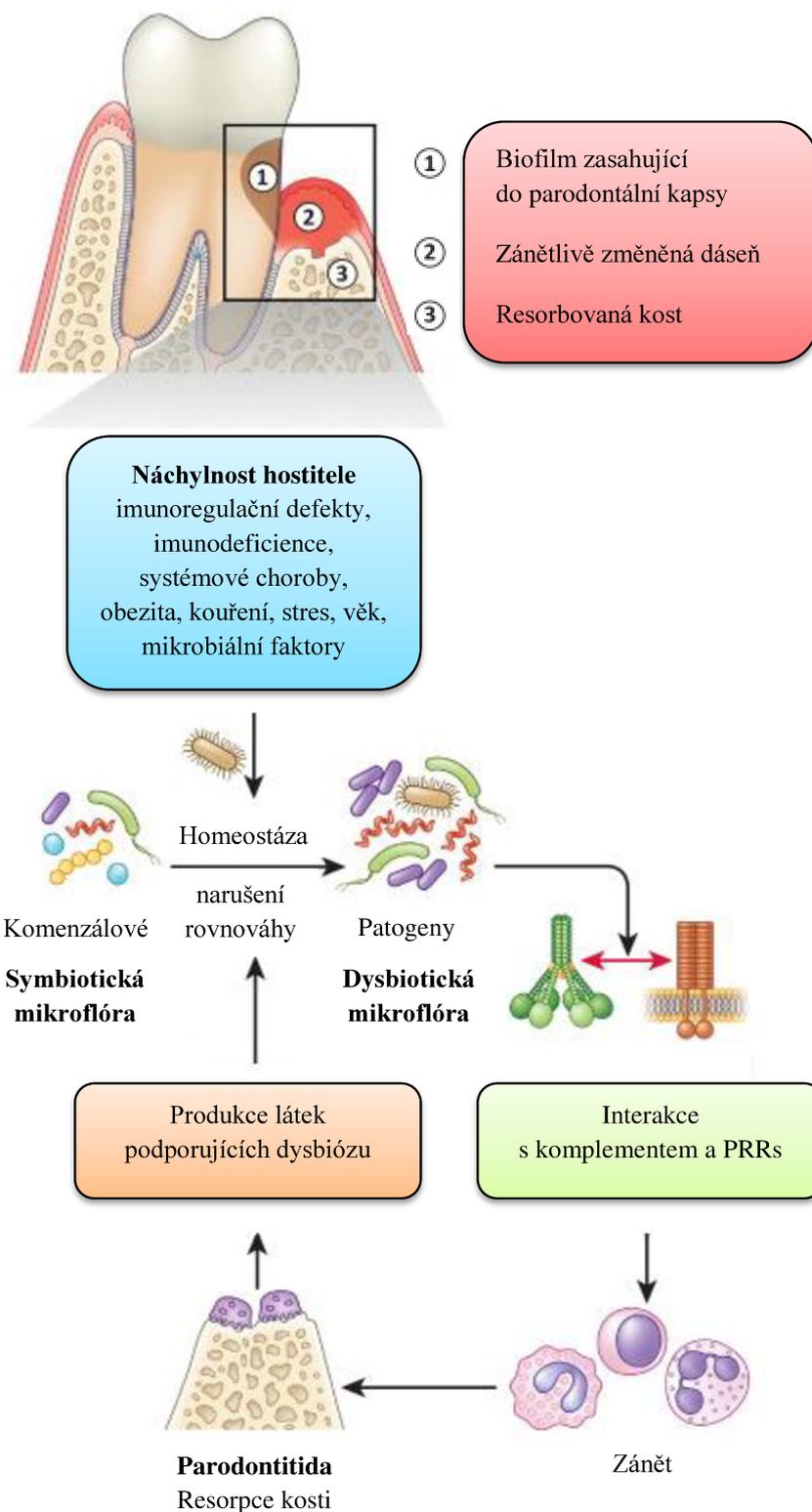
Poslední epidemiologické výzkumy uvádějí, že závažnou formou parodontitidy trpí 10 až 15 % populace a mírnou formou téměř 50 % dospělé populace.^{115,116} Dle klinického průběhu, mikrobiálního obrazu a účinnosti terapie můžeme parodontitidu rozdělit na agresivní (AgP) a chronickou (CP). V případě AgP dochází k rychlé destrukci alveolární kosti a ke ztrátě závěsného aparátu zubů u jinak zdravých pacientů. U CP, která je mnohem častější a vyskytuje se většinou po 35. roce života, je ztráta kosti a závěsného aparátu zubů postupná.¹¹⁷ Základním etiologickým faktorem rozvoje onemocnění parodontu je přítomnost bakterií zubního povlaku, které jsou nezbytnou, nikoliv však dostatečnou podmínkou rozvoje tohoto onemocnění. I když jenom na základě přítomnosti nebo absence určitých parodontálních patogenů nemůžeme říci, zda se jedná o AgP nebo CP, u pacientů s AgP je častěji detekována bakterie *A. actinomycetemcomitans*. Nicméně existuje také mnoho pacientů s AgP, u kterých tato bakterie není přítomna.^{7,118}

V etiologii parodontitidy se uvažuje o významném podílu náchylnosti hostitele determinované alespoň částečně genetickými faktory. Studie na dvojčatech potvrdily až 50% účast dědičnosti na vzniku a progresi CP.¹³ Neméně významné jsou však i faktory environmentální, z nichž největší podíl připadá na bakterie plaku. Existují tři hypotézy o úloze zubního plaku, organizovaného společenství mikroorganismů adheujícího na povrch zubů a tvořícího biofilm, v etiologii parodontitidy. Jako první byla vyslovena nespecifická teorie plaku, která

předpokládá, že zvýšené množství plaku je příčinným faktorem onemocnění parodontu.^{119,120} Disproporce první teorie s faktem, že u některých pacientů s dobrou orální hygienou a nízkou úrovní plaku se parodontitida vyskytuje, směřovala ke vzniku specifické teorie plaku. Ta se zaměřila na kvalitativní analýzu namísto kvantitativní a za patogenní označila pouze určité mikroorganismy, tedy předpokládá, že roli nehraje množství, ale složení plaku.¹²¹ Nicméně ani tato teorie nepodává kompletní vysvětlení dané problematiky, proto se objevila ekologická hypotéza plaku sledující narušení homeostázy ve složení orální mikroflóry v souvislosti s environmentálními a hostitelskými faktory.^{122,123} Změny bakteriálního osídlení v dutině ústní mohou být vyloženy dvěma způsoby. Můžeme to pokládat za důkaz toho, že s parodontidou asociovaný mikrobiální komplex obsahuje nové druhy nebo parapatogeny, které u zdravých jedinců nejsou přítomny, případně jsou jen velice obtížně zjistitelné. Druhé vysvětlení je, že nemoc je způsobena dysbiózou vedoucí ke změnám v interakcích mezi hostitelem a mikroorganismy, což má za následek rozvoj zánětlivé odpovědi.¹²⁴ K činitelům narušujícím mikrobiální homeostázu v dutině ústní se řadí jak faktory exogenní (mikrobiální faktory, kouření, atd.), tak i endogenní (poruchy metabolismu, autoimunitní a geneticky podmíněné imunologické choroby), a také následná imunologická odpověď na tyto podněty, viz **Obrázek 1.**¹²⁵

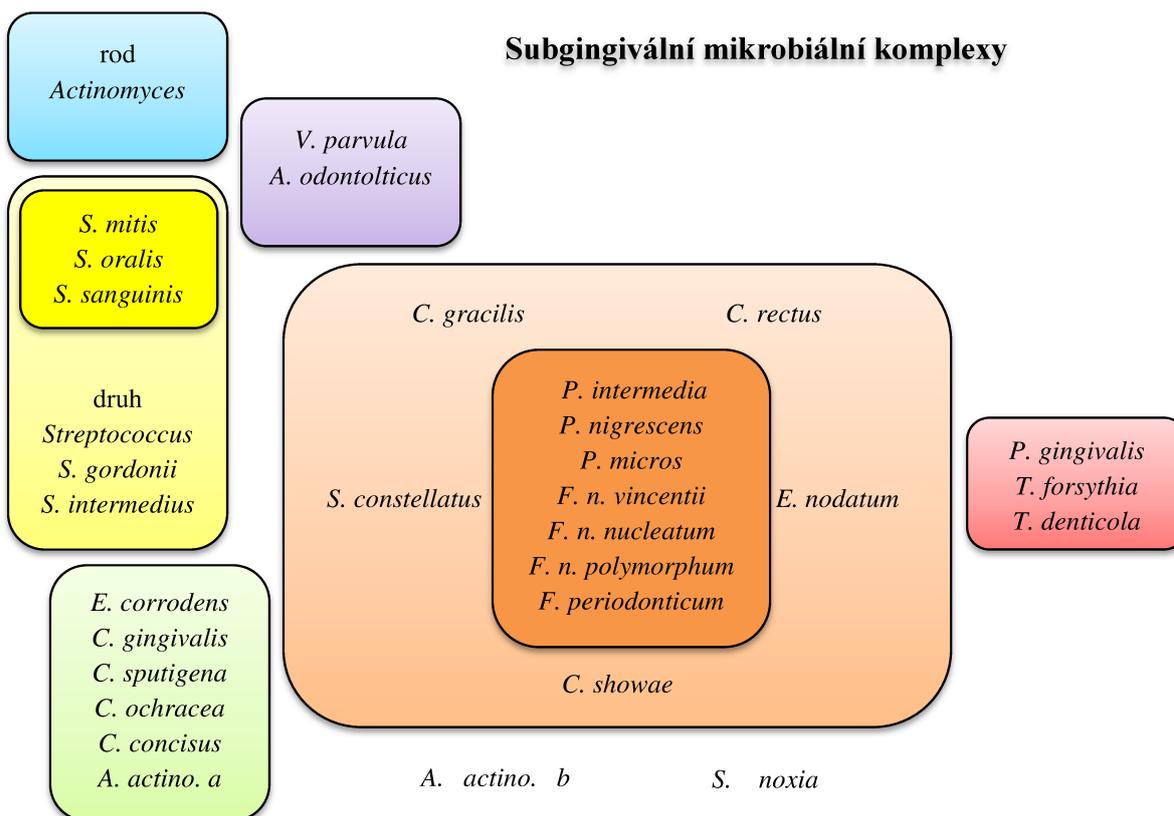
Složení mikrobiální flóry má tedy zásadní význam pro vznik a rozvoj onemocnění parodontu. U zdravých osob v gingiválním sulku dominují z 85 % anaerobně fakultativní G+ mikroorganismy, především z rodu *Streptococcus*, *Actinomyces*, dále také *Nesseria* a *Nocardia*. V případě zánětu se mění subgingivální mikroflóra od G+ koků k striktně anaerobním G- tyčkáům (*P. gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*) a spirochetám.^{126,127} Socransky et al. rozdělili bakterie do 5 barevných komplexů, viz **Obrázek 2.** Patogeny oranžového, a zejména červeného komplexu (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) jsou významně asociovány s parodontidou a s hloubkou parodontálních chobotů.⁶

Etiologie parodontitidy



Obrázek 1: Parodontitida způsobená polymikrobiální synergií a dysbiózou u citlivých hostitelů. Homeostáza mezi hostitelem a bakteriemi subgingiválního biofilmu je ovlivněna náchylností hostitele k parodontitidě, kdy tato citlivost zahrnuje defekty imunitního systému

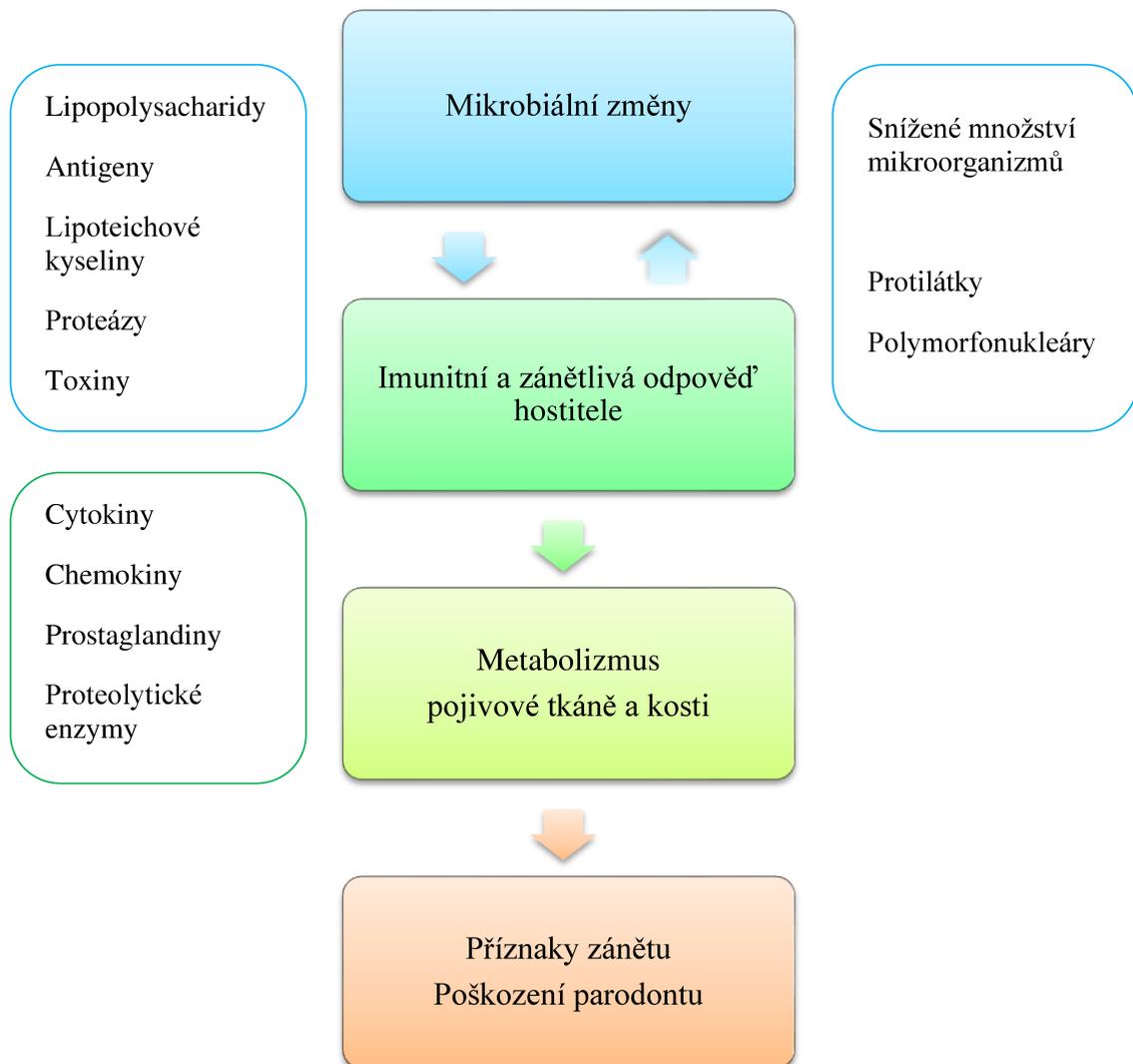
hostitele, predisponující podmínky a environmentální faktory. Při narušení homeostázy dochází k dysbióze, kdy se komenzálové mění v patogenní mikroorganismy. Interakcí parapatogenů s komplementem a receptory rozpoznávající patogeny (PRRs) je aktivován imunitní systém hostitele. Výsledkem je zánětlivá destrukce parodontálních tkání s následným úbytkem kostní hmoty, přičemž se tvoří látky podporující dysbiózu a tkáňové poškození, což vede k vytvoření patogenního cyklu.¹²⁵



Obrázek 2: Subgingivální mikrobiální komplexy, rozdělení bakterií do 5 barevných komplexů. Postup kolonizace v čase je znázorněný zleva doprava.⁶

Parodontitida je v současnosti považována za infekční chorobu indukovanou G- bakteriemi, které stimulují zánětlivou imunitní odpověď specifickými molekulovými vzory asociovanými s patogenem (PAMPs) a faktory bakteriální virulence.^{6,128} Poškození parodontu je způsobeno jednak látkami produkovanými bakteriemi, ale i působky vznikajícími během zánětlivé reakce.¹²⁹ Schématicky je patogeneze parodontitidy nastíněna na **Obrázku 3**.¹³⁰

Patogeneze parodontitidy



Obrázek 3: Schéma patogeneze parodontitidy¹³⁰

G- bakterie secernují metabolické produkty (amoniak, indol, sirovodík) schopné poškozovat parodontální tkáň. Dále produkují lipopolysacharidy (LPSs), peptidoglykany, lipoteichovou kyselinu, kolagenázy a další enzymy, antigeny a proteolytické enzymy destruuující imunoglobuliny a složky komplementu. Tyto PAMPs jsou následně rozpoznávány receptory rozpoznávající patogeny (PRRs), především toll-like receptory (TLRs), na povrchu hostitelských buněk a jsou iniciátory zánětlivé odpovědi.¹³¹ Akutní zánět se vyznačuje zvýšenou cévní permeabilitou vedoucí k zvýšené produkci sulkulární tekutiny a zesílenému prostupu leukocytů do místa poškození.

V rámci nespecifické imunitní reakce nastupují v první obranné linii proti infekčnímu agens polymorfonukleární leukocyty (PMNs), především fagocytující neutrofilní granulocyty, které jsou do místa zánětu přitahovány chemoaktivními látkami (např. IL-8).¹³² Po fagocytóze a lysozomálním štěpení bakterií dochází k uvolnění enzymatických látek (např. kolagenáz), které mají schopnost rozpouštět okolní vazivové struktury. Další složkou přirozené imunitní odpovědi proti invazi bakterií jsou mononukleární fagocyty, k jejichž aktivaci dochází po rozpoznání bakteriálních LPSs CD14 (diferenciační skupina 14) ko-receptory TLR-4.¹³³ Makrofágy jsou schopné uvolňovat prozánětlivé cytokiny IL-1 a tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α)¹³⁴, které mohou napomoci vcestování monocytů do místa zánětu pomocí monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1) produkovaného fibroblasty periodontálních vazů.^{135,136} Uvolňované cytokiny (interleukiny, interferony) mají pak v patogenezi parodontitidy zásadní význam, jedná se o intercelulární posly představující klíčový mechanismus, kterým jsou buňky účastníci se imunitních reakcí schopné komunikovat.^{4(p315)}

U pokročilých stavů jsou v zánětlivém infiltrátu akumulovány převážně buňky specifické imunity, B-lymfocyty a plazmatické buňky, zatímco T-lymfocyty představují spíše minoritní frakci.^{4(p316)} Po zpracování bakteriálního antigenu buňkami schopnými prezentovat antigen (např. dendritické buňky) je tento v komplexu s molekulami HLA (hlavní histokompatibilní systém) předložen právě T-lymfocytům. Součinnost T- a B-lymfocytů potom vede ke klonální expanzi B-lymfocytů a produkci sekrečních Ig, protilátek, které jsou transportovány na povrch sliznic. V gingiválních tkáních postižených chronickým zánětem byla pozorována silná specifická IgG a IgA odpověď proti bakteriím rodu *Bacteroides* (*P. gingivalis*).¹³⁷ IgG se vážou na bakterie v procesu zvaném opsonizace a usnadňují tak rozpoznání patogenů fagocytujícími leukocyty, zatímco sekretonický IgA obsažený ve slinách zabraňuje vazbě bakterií na povrchy v dutině ústní. Po vytvoření komplexu antigen-protilátka, může být Fc-oblast protilátek vázána na příslušné Fc-receptory nacházející se na povrchu makrofágů, „přirozených zabíječů“ (NK buněk), neutrofilů a mastocytů. Komplex antigen-protilátka může také aktivovat systém komplementu, komplexu proteinů v séru mající různé funkce při zánětlivé reakci (chemotaxe neutrofilů, zvýšení permeability cévní stěny, opsonizace atd.). Parodontitida je onemocnění, u kterého nacházíme smíšený cytokinový profil¹³⁸, některé cytokiny, např. IL-12, IL-18, interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , se podílejí na imunitní odpovědi zprostředkované pomocnými T-lymfocyty typu 1 (TH1) a stimulují zejména buněčnou imunitu, zatímco jiné cytokiny, např. IL-4, IL-5, IL-3, se účastní TH2 imunitních odpovědí

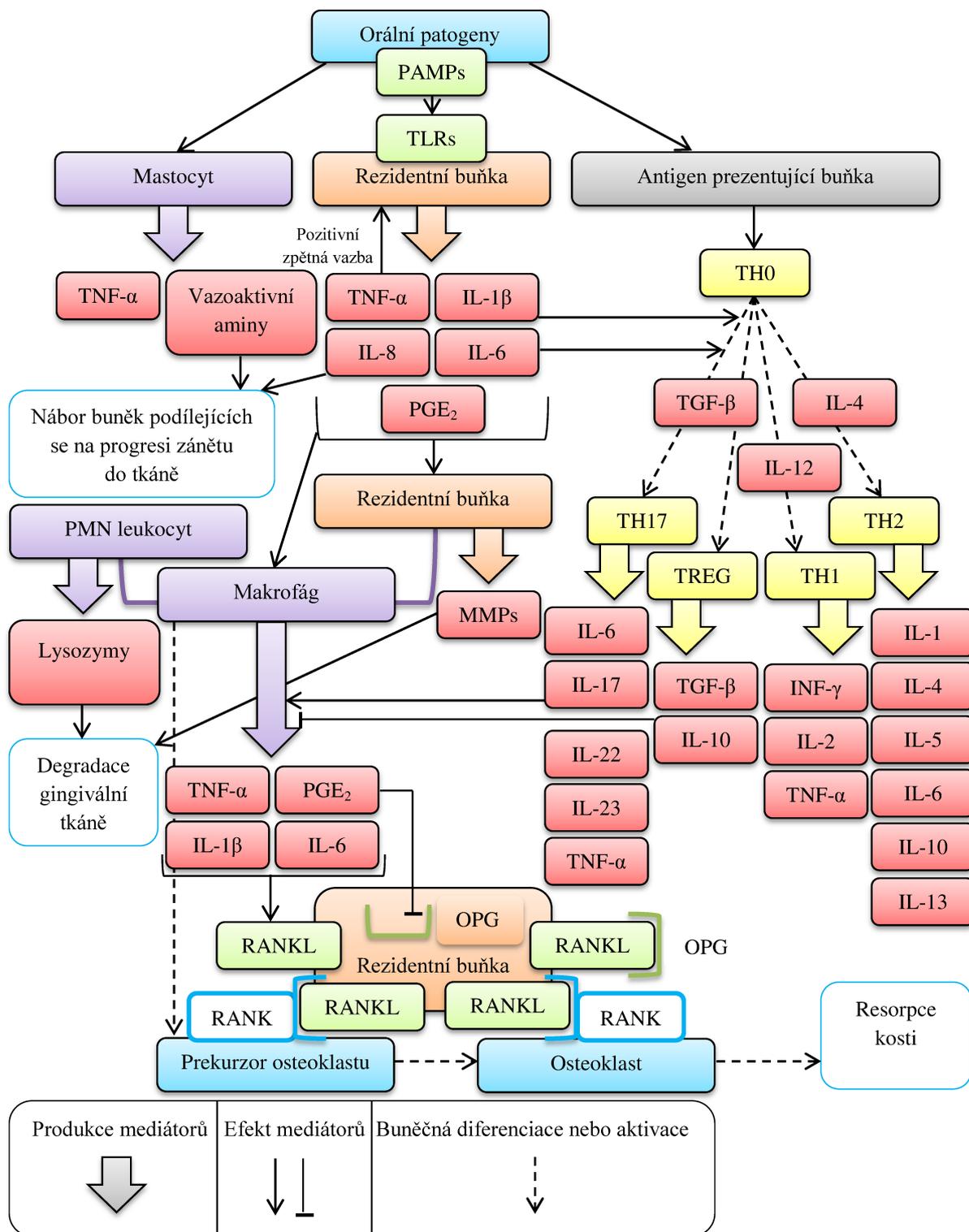
a podporují humorální imunitu tím, že podněcují růst B-buněk a jejich diferenciaci do plazmatických buněk.¹³⁹ Obecně se uznává, že kontrola TH1/TH2 rovnováhy je klíčová v imunoregulaci u onemocnění parodontu.¹⁴⁰ Na udržení TH1/TH2 rovnováhy se podílí více faktorů; klíčovou roli může mít také např. apolipoprotein E, který je schopen potlačovat produkci prozánětlivých cytokinů.¹⁴¹

Aktivované B- a T-lymfocyty (konkrétně TH1 a TH17) hrají významnou roli v patologické kostní resorpci řízené mechanismem závislým na RANKL. Interakce RANKL s jeho funkčním receptorem (RANK) na osteoklastovém prekursoru (OCP) je inhibována rozpustným receptorem OPG. Poměr RANKL/OPG se zvyšuje se zvyšující se zánětlivou aktivitou.¹⁴² Aktivované neutrofily mohou exprimovat membránově vázaný RANKL, a tím přímo stimulovat osteoklastogenezi. Stejný účinek skrze stimulaci RANKL má i aktivní forma vitamínu D (kalcitriol), která současně reguluje i mineralizaci kosti.^{143,144} Vitamín D se svým receptorem (VDR) má kromě toho vliv na imunitní funkce organismu.¹⁴⁵ Na potlačení osteoklastogeneze se na druhou stranu podílí například protizánětlivý cytokin IL-10 produkovaný regulačními T-lymfocyty (TREG).¹⁴⁶

Výsledkem aktivace obranných mechanismů hostitele, je zvýšená produkce cytokinů, chemokinů, prostaglandinů E (PGEs) a proteolytických enzymů (matrixové metaloproteinázy, MMPs), které ovlivňují pojivové tkáně a kostní metabolismus. Schématický přehled zánětlivých mediátorů účastnících se v patogenezi parodontitidy je znázorněn na **Obrázku 4**.¹³⁰

Na základě patogenetické hypotézy předpokládající komplexní vztahy mezi patogeny subgingivální mikroflóry a imunitní reakcí hostitele, kdy následkem těchto interakcí může docházet ke změnám v kostním metabolismu, byla analyzována řada kandidátních genů ve vztahu k parodontitidě. Jedná se o geny imunoregulačních faktorů (cytokiny, chemokiny, buněčné receptory, růstové faktory), antigen prezentujících faktorů (Fc-receptory, HLA) a o geny enzymů hrajících roli v tkáňových destruktivních procesech (MMPs) nebo geny proteinů zasahujících do kostního metabolismus (VDR, OPG, RANK, RANKL).^{14,147,148,149(pp31-94),150,151} Výsledky dosud publikovaných studií naznačují, že polymorfizmy v IL-1, IL-6, IL-10, VDR a CD14 genech mohou být asociovány s CP, přinejmenším v některých populacích.¹⁵² Při modelování náchylnosti k parodontitidě je přítomnost některých bakteriálních druhů (*T. forsythia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) v interakci se SNPs v TNF- α -857 a IL-1A -889 rozhodujícím faktorem pro rozvoj CP.¹⁵³

Zánětlivé mediátory v patogenezi parodontitidy



Obrázek 4: Zánětlivé mediátory v patogenezi parodontitidy¹³⁰

IL=interleukin, IFN- γ =interferon- γ , MMPs=matrixové metaloproteinázy, OPG=osteoprotegerin, PAMPs=molekulové vzory asociované s patogenem, PGE₂=prostaglandin E₂, PMN=polymorfonukleární leukocyt, TGF- β =transformující růstový faktor- β , TLRs=toll-like receptory, TH=pomocný T-lymfocyt, TNF- α =tumor nekrotizující faktor- α , TREG=regulační T-lymfocyt, RANK=aktivátor receptoru nukleárního faktoru κ B, RANKL=ligand aktivátoru receptoru nukleárního faktoru κ B

V minulosti byly také kolektivem našeho pracoviště zveřejněny práce, které zkoumaly u pacientů s chronickou formou parodontitidy polymorfizmy v genech pro CD14¹⁵⁴, TLR-4¹⁵⁵, TLR-9¹⁵⁶, receptor pro produkty pokročilé glykace (AGEs)¹⁵⁷, TNF- α a lymfotoxinu- α (TNF- β)¹⁵⁸, TNF- β , ACE (angiotenzin konvertující enzym) a endotelin-1¹⁵⁹, PAI-1 (inhibitor plazminogenového aktivátoru-1)¹⁶⁰, IL-4¹⁶¹, IL-6¹⁶², MMP-1¹⁶³, MMP-2¹⁶⁴, MMP-8¹⁶⁵, MMP-9¹⁶⁶ a IFN- γ .¹⁶⁷ Poslední uvedená práce, byla publikována v časopise Archives of Oral Biology pod názvem „Interferon- γ +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria”.¹⁶⁷ Tato studie kontrol-případů uvedená v **Příloze 1**, která nepotvrdila významnou roli daného polymorfizmu v genu pro INF- γ pro vznik CP, byla citována v celogenomové studii od Kim et al.¹⁶⁸ a v práci od Finoti et al.¹⁶⁹

Následující kapitoly v **sekci 5. A** obsahují soubor studií polymorfizmů v genech pro apolipoprotein E (viz **kapitola 5.1.1, Příloha 2**), IL-8 (viz **kapitola 5.3.1**)¹⁷⁰, IL-18 (viz **kapitola 5.4.1**). U pacientů s CP jsme se opětovně věnovali IL-4, kdy jsme sledovali vliv vybraných 2 polymorfizmů na produkci cytokinů (viz **kapitola 5.2.1, Příloha 3**). V **sekci 5. B** je kromě úvodního komentáře k přehledovému článku o vztahu DM a orálního zdraví (**Příloha 4**)¹⁷¹ uvedena také práce zaměřená na polymorfizmy v IL-1 genové klasteru u pacientů s AgP a CP s/bez DM (viz **kapitola 5.5.1**).

Popis zkoumaného souboru pacientů

Všichni pacienti, které jsme zařadili do níže popsanych studií případů-kontrol, byli vyšetřeni na Parodontologickém oddělení Stomatologické kliniky FNUSA v Brně v rozmezí let 2005 až 2013. Kontrolní skupina osob, kterou tvořili nepřibuzní jedinci bez onemocnění parodontu, byla vybrána náhodně během stejného období jako pacienti s parodontitidou tak, aby odpovídala nemocným věkem, pohlavím a prevalencí kouření. Podmínkou pro zařazení do studie byl u všech pacientů jejich dobrý zdravotní stav a přítomnost minimálně 20 vlastních zubů. Kritéria pro vyloučení osob ze studie byla především anamnéza kardiovaskulárních onemocnění (jako je například koronární onemocnění tepen nebo vysoký

krvní tlak), DM (kromě podskupin pacientů s touto chorobou), nádorových onemocnění, imunodeficiencie, těhotenství nebo kojení.

5.1 Apolipoprotein E - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Apolipoprotein E (ApoE) je pluripotentní glykoprotein, který hraje významnou roli v metabolismu lipidů^{172,173,174,175,176,177}, reverzním transportu lipidů z cévní stěny^{178,179}, endoteliální funkci¹⁸⁰ a při supresi zánětlivé odpovědi *in vivo*.¹⁸¹ ApoE je nejčastěji asociován se vznikem aterosklerózy, může mít ale vliv i na jiné biologické procesy, které nejsou přímo spojené s transportem lipidů; zde bychom mohli zmínit kromě Alzheimerovy choroby a dalších poruch kognitivních funkcí, také vliv na imunitní systém a některé infekční onemocnění.¹⁸²

ApoE je produkován v menší míře astrocyty a mikroglie v mozkové tkáni, ale především buňkami jaterní tkáně, kde se prostřednictvím ApoE vážou lipoproteiny na specifické receptory.^{183(p264)} Molekuly ApoE jsou syntetizovány také v cirkulujících makrofázích¹⁸⁴ a jejich produkce je u zralých buněk ovlivněna například endotoxiny a cytokiny, které mají negativní regulační efekt na tvorbu ApoE.¹⁸⁵ Stykem s imunitními komplexy dochází v makrofázích k rychlé degranulaci a uvolnění intracelulárních ApoE molekul.¹⁸⁴ Díky svým vlastnostem je ApoE schopný konvertovat prozánětlivý fenotyp makrofágů M1 na protizánětlivý fenotyp M2, u kterého je snižená motilita, tvorba prozánětlivých cytokinů a volných radikálů a snižená aktivace transkripčních faktorů NF- κ B (nukleární faktor κ B) a STAT1 (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 1).¹⁸⁶ O ApoE tedy můžeme uvažovat jako o molekule s protizánětlivými účinky.

Již dříve Dobson et al. prokázali, že vazebné místo na ApoE vykazuje přímou protiinfekční aktivitu proti různým virovým a bakteriálním druhům.¹⁸⁷ U dětských pacientů s podezřením na invazivní bakteriální infekci je dokonce možné využít detekce koncentrace ApoE v cerebrospinální tekutině jako nového diagnostického markeru.¹⁸⁸ V několika studiích bylo prokázáno, že infekce orálními patogeny *P. gingivalis* a *T. forsythia* akceleruje rozvoj a progresi aterosklerózy u ApoE-deficientních myší.^{189,190,191,192,193} V současnosti lze pozorovat vzrůstající zájem o výzkum směřující k asociaci mezi koncentracemi ApoE, jeho genetickými variantami a různými infekčními chorobami.

Gen pro ApoE glykoprotein je lokalizován na chromozomu 19 v pozici q13.2 a obsahuje tři kodominantní alely ϵ 2, ϵ 3 and ϵ 4, které se vyskytují ve všech světových populacích včetně evropské.¹⁹⁴ Tyto varianty odpovídají třem strukturálně a funkčně odlišným izoformám

proteinu E2, E3 a E4, a proto je možné rozlišit 6 různých haplotypů a fenotypů. Alela $\epsilon 3$ je v populaci zastoupena nejčastěji a kóduje izoformu proteinu E3 obsahující v pozici 112 cystein (Cys) a v pozici 158 arginin (Arg), izoforma E2 obsahuje v obou pozicích Cys a izoforma E4 obsahuje v obou pozicích Arg.^{195,196} Alela $\epsilon 2$ má nižší afinitu k receptorům odbourávajícím jaterní lipoproteinové částice než varianty $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, což vede k pomalejšímu odbourávání VLDL (lipoprotein o velmi nízké hustotě) a chylomikronů a k aktivaci LDL (lipoprotein o nízké hustotě) receptorů, čímž dochází ke snížení koncentrací LDL. Isoformy E2 a E3 preferují vazbu na HDL (lipoprotein o vysoké hustotě), zatímco E4 upřednostňuje vazbu na VLDL.¹⁹⁷ Tyto biochemické rozdíly mohou být zodpovědné za asociaci izoformem ApoE s různými patologickými procesy. Isoforma E4 je spojena s vyšším rizikem vzniku koronárních onemocnění¹⁹⁸, progresí onemocnění HIV¹⁹⁹ a s rozvojem Alzheimerovy choroby.^{200,201} Oproti tomu E2 izoforma, která může být protektivní u Alzheimerovy choroby a chronické HCV (hepatitida C virus) infekce²⁰², je asociovaná s familiární hyperlipoproteinemií III typu²⁰³, s Parkinsonovou chorobou²⁰⁴ a s rizikem rozvoje T2DM.^{201,205}

5.1.1 Komentář k publikaci „Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria and lipid levels“

V dubnu roku 2014 byl odeslán rukopis s názvem „Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria and lipid levels“ do časopisu *Gene*. Původní verze práce, která je nyní v recenzním řízení, je uvedena v **Příloze 2**.

Na základě výsledků předchozích studií, kdy u neléčených pacientů s parodontidou byly pozorovány vyšší koncentrace celkového i LDL cholesterolu a triglyceridů (TG), oproti nižším koncentracím HDL cholesterolu^{206,207,208,209,210,211,212,213}, bylo cílem naší práce analyzovat dva polymorfizmy v ApoE genu (rs429358 a rs7412) u pacientů s CP nejen ve vztahu k naměřeným lipidovým hladinám, ale také k výskytu vybraných parodontálních patogenů.

Do této studie kontrol-případů bylo zařazeno 469 nepříbuzných osob, z toho 294 pacientů s CP a 175 zdravých kontrol. Subgingivální bakteriální kolonizace (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*) byla vyšetřena u podskupiny náhodně vybraných osob (168 pacientů s CP a 114 kontrol) s využitím diagnostického kitu založeného na DNA mikročipové technice. Hladiny lipidů (LDL, HDL, celkového cholesterolu a TG) byly měřeny kolegy z Ústavu

klinické a experimentální stomatologie 1. LF Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. DNA izolace a analýza genotypů proběhla dle metodiky obsažené v naší již dříve uveřejněné práci uvedené v **kapitole 5.1.2.**²¹⁴

Neprokázali jsme asociaci mezi ApoE polymorfizmy a CP. U pacientů s parodontitidou jsme ale naměřili zvýšené hladiny celkového a LDL cholesterolu ve srovnání s kontrolními osobami ($P < 0,05$); hladiny TG a HDL cholesterolu mezi oběma skupinami nebyly signifikantně odlišné. Genová variabilita v ApoE měla marginálně významný vliv na hladiny LDL cholesterolu ($P = 0,07$), kdy nejvyšší hladiny LDL byly přítomny u osob s genotypem $\epsilon 3/\epsilon 4$ (medián = 3,67 mmol/l), nižší byly u nositelů genotypů $\epsilon 2/\epsilon 3$ (medián = 2,84 mmol/l) a nejnižší v přítomnosti kombinace genotypu $\epsilon 3/\epsilon 3$ (medián = 2,34 mmol/l). Naproti tomu, signifikantní vliv ApoE genotypů na koncentrace celkového cholesterolu, triglyceridů a HDL cholesterolu nebo na výskyt parodontálních patogenů jsme nenalezli.

Můžeme tedy konstatovat, že v české populaci nebyly polymorfizmy (rs429358 a rs7412) v ApoE genu asociovány s náchylností k CP nebo s přítomností parodontálních bakterií v parodontálních chobotech. Nicméně, pacienti s CP měli zvýšené hladiny celkového a LDL cholesterolu, přičemž ApoE genotypy se mohou podílet na ovlivnění hladiny LDL cholesterolu ($P = 0,07$). Bohužel naše výsledky nemohou být porovnány s jinými studii, jelikož toto je první práce zabývající se variabilitou v ApoE genu u onemocnění CP.

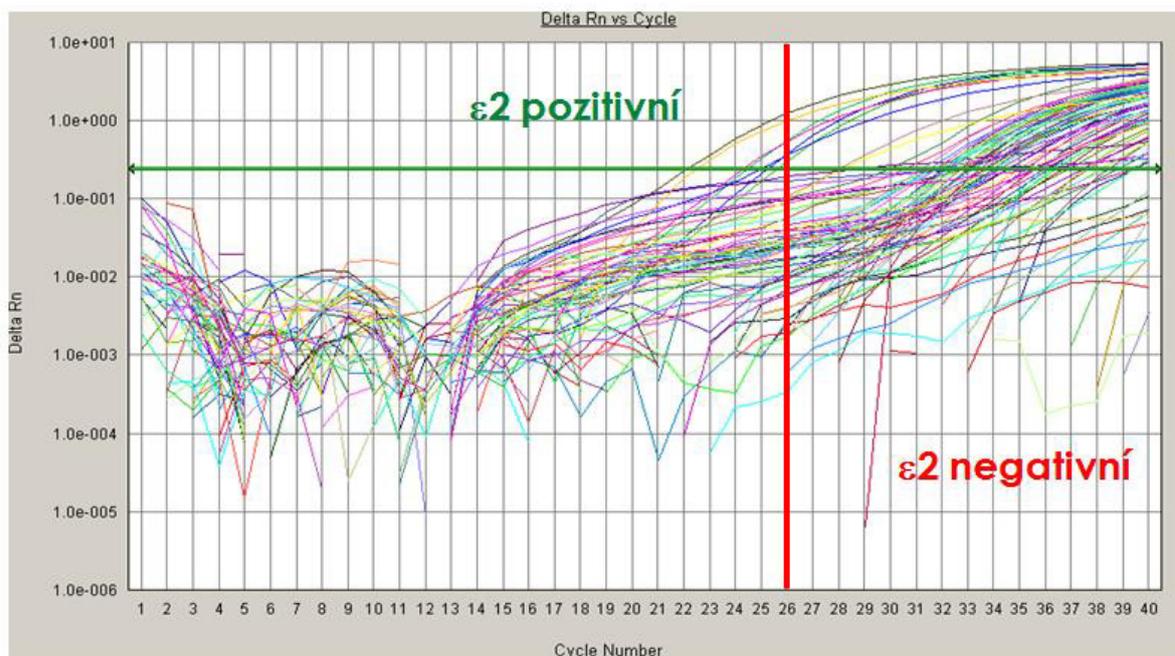
Nález zvýšených hladin lipidů u pacientů s CP je v souladu s výsledky studií v jiných populacích.^{206,210,211,213} V několika studiích sledovali vliv ApoE variability na změny v hladinách lipidů u zdravých pacientů, kdy alela $\epsilon 2$ byla asociována s nižšími hladinami celkového i LDL cholesterolu.^{215,216,217} V alžírské populaci našli vyšší koncentrace TG, celkového i LDL cholesterolu u pacientů nesoucích alelu $\epsilon 4$ ve srovnání s pacienty s $\epsilon 3$ alelou²¹⁸, což je v souladu s našimi výsledky, kdy nejvyšší hladiny LDL cholesterolu jsme zaznamenali v přítomnosti genotypu $\epsilon 3/\epsilon 4$ a nejnižší u pacientů s $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotypem.

5.1.2 Apolipoprotein E - metodika v publikaci „Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD”

V roce 2012 byl v časopisu Biomedical Papers uveřejněn originální článek s názvem „Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD”.²¹⁴ Článek je v kapitole uvedený pod stručným komentářem k použité genotypizační metodice, kterou jsem pro studii

MUDr. Jana Máchala, Ph.D. z Ústavu patologické fyziologie, LF MU v Brně navrhla a optimalizovala. Postup při genetické analýze polymorfizmů v ApoE byl využit při stanovení genotypů u pacientů s CP a u zdravých kontrol, viz **kapitola 5.1.1**.

Od pacientů byly vzorky DNA získány fenol-chloroformovou extrakcí z leukocytů periferní krve. Pro analýzu genové variability v ApoE jsme vybrali dva polymorfizmy ve 4. exonu, 112Cys/Arg C/T (rs429358) a 158Cys/Arg C/T (rs7412), které determinují alely $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, viz **kapitola 5.1**. Analýza proběhla na základě metodického postupu uvedeného v publikaci Calero et al.²¹⁹ s mírnými úpravami, které se týkaly koncentrace primerů v reakční směsi z důvodu tvorby nežádoucích dimerů. Kombinací čtyř alelově specifických primerů byly pak vytvořeny tři reakční směsi pro každý vzorek. Principiálně se jednalo o metodu PCR v reálném čase (real-time PCR) provedenou na přístroji ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) se současnou vizualizací interkalačním barvivem SYBR[®] Green, které bylo obsaženo v komerčně dodávaném Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life technologies, Grand Island, NY, USA). Rozhodující pro určení pozitivního nebo negativního výsledku genotypizace pro konkrétní alelu určenou kombinací alelově specifických primerů bylo stanovení hranice maximálního počtu uskutečněných reakčních cyklů, které poskytují dostatečný nárůst koncentrace amplikonu v reakční směsi, viz **Obrázek 5**. U všech tří alel jsme tuto hranici nastavili na konec 26. cyklu.



Obrázek 5: Příklad real-time PCR monitorované barvivem SYBR[®] Green na přístroji ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Záznam ukazuje výsledky

genotypizace kontrolního souboru 92 pacientů pro alelu Apoε2. Červená linka definuje hranici počtu cyklů, která je rozhodující při vyhodnocení positivity nebo negativity reakce na přítomnost dané alely pro jednotlivé vzorky. Zelená linka určuje hranici pro minimální koncentraci amplikonu, při které můžeme reakci hodnotit jako pozitivní. Z obrázku lze vyčíst, že pozitivních na alelu Apoε2 bylo 7 vzorků, což reflektuje skutečnost, že alela Apoε2 je v evropské populaci zastoupena pouze v 5 až 15 %.²²⁰

5.2 Interleukin-4 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Interleukin-4 (IL-4) je pleiotropní cytokin inhibující TH1 buňky a stimuluje TH2 imunitní odpověď, který se váže na IL-4 receptor B-lymfocytů. IL-4 byl původně nazýván B-buňky stimulující faktor-1 (BSF-1)^{221,222}, protože může chránit B-lymfocyty před apoptózou, zlepšit jejich přežití, a tím podpořit imunitní odpověď zprostředkovanou B-lymfocyty.²²³ Současně je tento protizánětlivý cytokin schopný potlačit aktivaci monocytů²²⁴ a podpořit jejich apoptózu.²²⁵ V lidských monocytech je IL-4 zodpovědný také za snížení exprese CD14, který je jedním z klíčových receptorů pro rozpoznání LPSs.²²⁶

Shapira et al. vyslovili hypotézu, že nedostatek regulačního cytokinu IL-4 v gingivální tkáni předurčuje citlivé jedince k progresi zánětu gingivy do parodontitidy²²⁷ Několik dalších studií zkoumalo koncentraci IL-4 mRNA a hladiny proteinu u různých parodontálních lézí^{228,229}, v GCF^{230,231} a v séru pacientů s parodontitidou.²³² Tsai et al. naznačili, že nízký poměr IL-4 a IFN- γ hladin může být spojen s destrukcí parodontálních tkání, zatímco zvýšený poměr může vést ke zlepšení klinického stavu parodontu.²³¹

Gen pro IL-4 se nachází na dlouhém raménku chromozomu 5q31.1 v genovém klasteru pro TH2 cytokiny.^{233,234} V promotorové oblasti existují polymorfizmy -590C/T a -34C/T a v intronu 3 je často studován VNTR polymorfismus vyznačující se 70 bp repeticemi. Kontroverzních výsledků bylo dosaženo při studiu souvislostí mezi variabilitou v IL-4 genu u pacientů s AgP/CP v různých populacích.^{161,235,236,237,238,239,240,241,242} Gonzales et al. prokázali souvislost mezi genotypy IL-4 -590TT a -34TT s AgP²³⁹, zatímco Izakovičová Hollá et al. asociovali určité IL-4 haplotypy se zvýšeným rizikem pro rozvoj CP v české populaci¹⁶¹ a Anovazzi et al. zase v brazilské populaci.²⁴² Ve švédské populaci nebyl nalezen vztah polymorfizmu Q551R (Q=glutamin, Gln) v IL-4RA (antagonista IL-4 receptoru) u pacientů s CP v porovnání se zdravými kontrolami²⁴³, zatímco v německé populaci se zdá, že tento polymorfismus může být spojen s rizikem vzniku CP, ale nebyl asociován s AgP.²⁴⁴ V celkové kohortě pacientů s parodontitidou byla prokázána interakce mezi uvedeným polymorfizmem a přítomností *T. forsythia*.²⁴⁴

5.2.1 Komentář k publikaci „The effect of IL-4 polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and healthy controls”

Aktuálně byla ve spolupráci s Ústavem klinické a experimentální stomatologie 1. LF Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze sepsána práce „The effect of IL-4 polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis

and healthy controls”, jejíž dosud nerecenzovaná verze je zařazena do **Přílohy 3**. Tato práce, na které jsem se podílela především v rámci genetické analýzy zkoumaných polymorfizmů, byla odeslána v dubnu roku 2014 do časopisu *Mediators of Inflammation*.

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv IL-4 polymorfizmů -590C/T a 70 bp VNTR v intronu 3 na produkci cytokinů po stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve bakteriemi zubního plaku, mitogeny a HSP70 (heat shock protein 70) u pacientů s CP a u zdravých kontrol.

Do studie jsme zařadili 47 pacientů s CP a 15 zdravých kontrol. U SNP -590C/T jsme provedli genetickou analýzu dle protokolu v publikaci Hegab et al., principiálně se jednalo o PCR s následnou restrikční analýzou enzymem *BsmFI*.²⁴⁵ Počet tandemových repetitivních sekvencí v intronu 3 IL-4 genu jsme stanovili dle práce od Mout et al. a využili jsme PCR s vizualizací ampliconu po elektroforetickém rozdělení na agarózovém gelu.²⁴⁶ U 70 bp VNTR polymorfizmu jsme jako alelu 1 označili tu o délce 245 bp, což odpovídá 3 repetitivním, a alelu 2 (184 bp) se dvěma repetitivními. V naší studii jsme v dané kohortě pacientů nenalezli alelu typu 3 s jedním opakováním (114 bp).

Produkce cytokinů (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , INF- γ , VEGF= vaskulární endoteliální růstový faktor) jsme studovali po *in vitro* stimulaci mononukleárních buněk izolovaných z periferní krve mitogeny (Pokeweed mitogen, Concanavalin A), bakteriemi zubního plaku (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) a HSP70 systémem Luminex multiplex pro cytokinovou analýzu. Výsledky jsme korelovali s IL-4 genotypy, a to zvláště u pacientů s CP a u zdravých kontrol.

Oba studované polymorfizmy byly u zdravých kontrol v Hardy-Weinbergově rovnováze. Alelické ani genotypové frekvence nebyly významně odlišné mezi kontrolními osobami a pacienty s CP ($P > 0,05$). Pacienty s parodontitidou i kontroly jsme rozdělili do dvou skupin dle polymorfizmů v IL-4 genu (homozygoti pro CC vs. skupina CT+TT genotypů pro -590C/T varianty a homozygoti 11 vs. skupina 12+22 genotypů pro VNTR). V publikované práci jsme v tabulkách zaznamenali mediány hladin cytokinů naměřených po 3 denní *in vitro* stimulaci monocytů izolovaných z periferní krve pacientů s CP a zdravých kontrol pomocí bakterií zubního plaku, mitogenů a HSP70.

Vyhodnocení výsledků pomocí Kruskal-Wallisova testu ukázalo, že naměřené koncentrace IL-4 a IL-5 (v pgml^{-1}) byly velmi nízké a neprokázali jsme žádné významné rozdíly mezi oběma skupinami v hladinách těchto cytokinů. Naopak hladiny IL-6 byly relativně vysoké u pacientů s CP i u kontrolních osob. Hladiny IL-6 po stimulaci lymfocytů bakterií

P. intermedia u pacientů nesoucích IL-4 - 590CC a IL-4 VNTR11 genotyp byly významně vyšší než u nositelů ostatních genotypů ($P < 0,05$). Podobný statisticky významný rozdíl v produkci IL-6 a TNF- α po stimulaci *T. forsythia* jsme zjistili v přítomnosti IL-4 VNTR11 genotypu při porovnání s genotypy 12 nebo 22 ($P < 0,05$).

Větší produkci IFN- γ jsme zaznamenali u lymfocytů od pacientů s CP nesoucích genotyp -590CC ($P < 0,01$) nebo genotyp VNTR11 ($P < 0,05$) po stimulaci *T. forsythia*, a současně větší produkci IL-10 jsme našli po stimulaci bakteriemi *T. forsythia* a *P. intermedia* (od $P < 0,001$ k $P < 0,05$). Na druhou stranu jsme u pacientů s CP nesoucích odlišné IL-4 genové varianty nezjistili žádné významné rozdíly v produkci IL-17 a IL-1 α po stimulaci bakteriemi zubního plaku. Produkce IL-1 β byla významně vyšší u pacientů s parodontitidou nesoucích -590CC genotyp po stimulaci *T. forsythia* a v nestimulované kultuře ($P < 0,05$). Dále jsme zjistili, že osoby s genotypem IL-4 VNTR11 produkují více IL-1 β po stimulaci téměř všemi agens (od $P < 0,001$ k $P < 0,05$), s výjimkou stimulace *P. gingivalis* a *P. intermedia* ($P > 0,05$).

Ve skupině zdravých kontrol jsme pozorovali statisticky významné difference pouze mezi osobami s CC vs. CT+TT genotypy IL-4 -590 polymorfizmu po stimulaci *T. forsythia* ($P < 0,05$). Největší rozdíl v produkci IL-1 α cytokinu jsme zaznamenali mezi kontrolními osobami nesoucími genotyp CT+TT vs. CC IL-4 -590 polymorfizmu po stimulaci HSP70, *A. actinomycetemcomitans* a v nestimulované kultuře ($P < 0,05$). Významně vyšší produkci IL-1 α jsme našli také v nestimulované kultuře u pacientů s genotypem IL-4 VNTR11. Součástí práce je obrázek znázorňující výsledky interakcí mezi jednotlivými proměnnými vyhodnocených Spearmanovou korelační analýzou, viz **Příloha 3**.

Dle výsledků předchozích studií od Bártové et al.²⁴⁷ a Krátké et al.²⁴⁸ jsme předpokládali, že u pacientů s CP by IL-4 genové polymorfizmy po stimulaci bakteriemi zubního plaku mohly mít vliv na produkci IL-4. Ačkoli se tato hypotéza nepotvrdila, zjistili jsme, že uvedené varianty po stimulaci *T. forsythia* a *P. intermedia* mají dopad na produkci jiných cytokinů, což je v souladu s předpoklady některých dalších prací sledujících například vliv přítomnosti *P. gingivalis* na produkci různých cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) v lidských parodontálních kmenových buňkách²⁴⁹, v mononukleárních buňkách periferní krve^{250,251} nebo v TH buňkách u pacientů s AgP.²⁵²

Naše práce tedy poukazuje na význam TH2 buněčné subpopulace a variability v IL-4 genu u onemocnění parodontu. Z výsledků studie vyplývá, že mononukleární buňky izolované

z periferní krve pacientů postižených CP, které nesou určité kombinace IL-4 polymorfizmů, se významně podílejí na změně produkce IFN- γ , IL-10, IL-1 α a IL-1 β , TNF- α a IL-6 po stimulaci HSP70 nebo vybranými parapatogeny. Jedním z nejdůležitějších zjištění je fakt, že SNP -590C/T v promotoru a 70 bp VNTR polymorfizmus v intronu 3 genu kódujícího IL-4 mají vliv nejenom na produkci tohoto „vlastního“ proteinu, ale také na produkci jiných cytokinů v odpovědi na působení bakterií zubního plaku, HSP70 a vybraných mitogenů, kdy tento účinek je mnohem výraznější u pacientů s CP než u zdravých kontrol.

5.3 Interleukin-8 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Interleukin-8 (IL-8), který je členem IL-8 CXC chemokinové rodiny, poprvé popsali Matsushima a Oppenheim v roce 1989.²⁵³ Jedná se o nejdůležitější chemoatraktivní cytokin a aktivátor neutrofilních granulocytů²⁵⁴ zapojující se do iniciace a amplifikace akutní zánětlivé reakce a chronických zánětlivých procesů. Funkce IL-8 je zprostředkována přes dva chemokinové receptory (CXCR1 a CXCR2) a jeho exprese byla detekována v různých buněčných liniích včetně neutrofilů a epitelálních buněk.²⁵⁵ Gingivální epitelální buňky (GEC) jsou schopné rychlého zvýšení exprese IL-8 v odpovědi na přítomnost *A. actinomycetemcomitans*. Usnadnění vcestování neutrofilů do místa postižení gingivy jsou posíleny nespecifické obranné mechanismy organismu.^{256,257} IL-8 exprese v GEC je indukována také bakteriemi *P. gingivalis*²⁵⁸ a *T. forsythia*²⁵⁹, kultury gingiválních fibroblastů jsou k produkci IL-8 stimulovány LPSs z *P. gingivalis* a *P. intermedia*.²⁶⁰ Hladiny IL-8 v GCF jsou pak cenným markerem při detekci zánětu v parodontálních tkáních.^{261,262,263} U pacientů s CP se po parodontální léčbě snižuje koncentrace IL-8 v GCF.²⁶⁴

IL-8 je kódován genem lokalizovaným na chromozomu 4 q13-21 (GenBank accession number M28130.1), který je složený ze 4 exonů, 3 intronů a promotorové oblasti.²⁶⁵ V IL-8 genu bylo nalezeno několik polymorfizmů^{266,267,268,269}, z nichž některé regulují produkci IL-8. V brazilské populaci byly u pacientů s AgP a CP studovány SNPs IL-8 -845T/C (rs2227532), -738T/C, -251A/T (rs4073, dříve popsán jako -353A/T), +396T/G (rs2227307), +781C/T (rs2227306).^{270,271,272,273,274,275} Kromě toho, IL-8 -251T alela, která byla spojena s vyšší produkcí IL-8, představuje zvýšené riziko rozvoje akutní hnisavé formy apikální parodontitidy (AP), zatímco alela IL-8 -251A alela byla v kolumbijské populaci spojena s chronickou nehnisavou formou AP.²⁷⁶ V čínské populaci byla IL-8 -251A alela, která je zodpovědná za nižší produkci IL-8 proteinu, asociována se sníženou citlivostí rozvoje CP.²⁷⁷

Průřezová studie v Íránu se také zaměřila na studium polymorfizmů v genu pro IL-8, ale nebylo specifikováno, zda se jednalo o pacienty s CP nebo AgP.²⁷⁸

IL-8 -251AT genotyp byl spojen se zvýšenými hladinami IL-8 mRNA transkriptů a A alela se zvýšeným rizikem rozvoje parodontitidy v předchozí práci od Andia et al.²⁷⁵ To je v souladu s pozorováním, že alela A IL-8 -251 je spojena s vyšší produkcí IL-8 v LPS-stimulované lidské krvi.²⁶⁸

5.3.1 Komentář k publikaci „Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis”

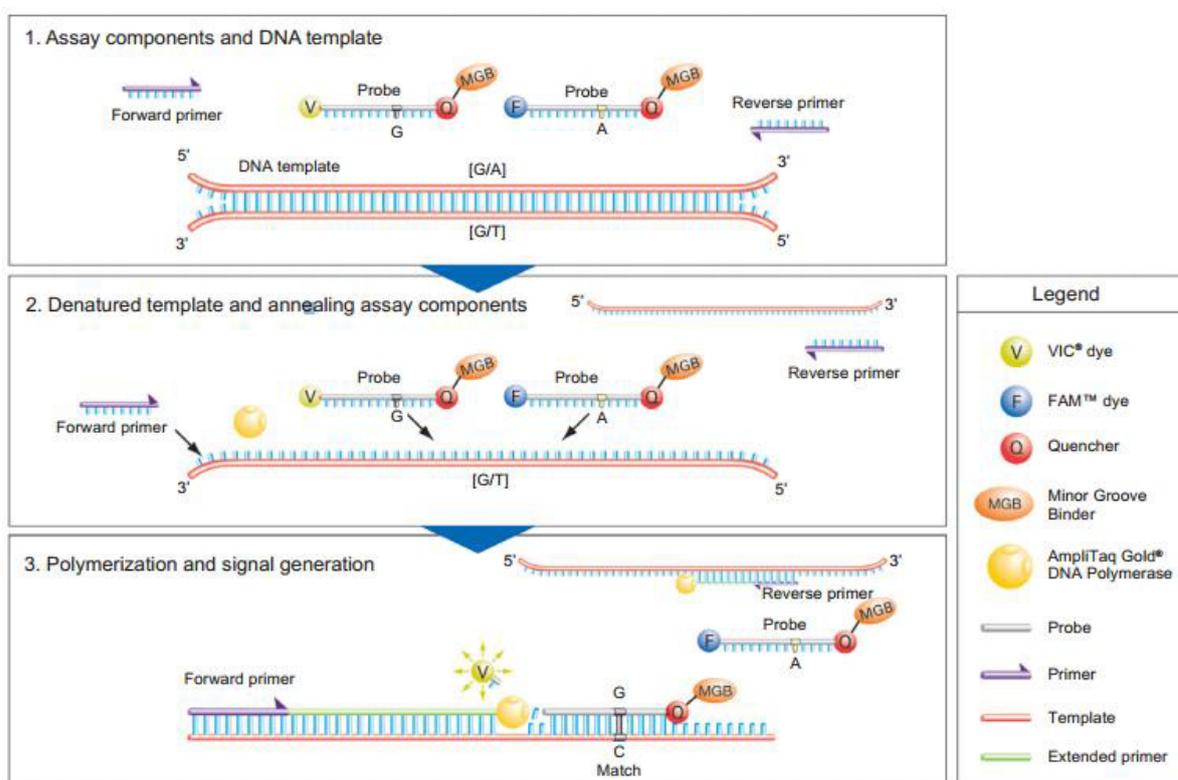
V roce 2013 byl v časopisu *Mediators of Inflammation* publikován článek s názvem „Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis“, který je součástí této kapitoly.¹⁷⁰

K dnešnímu dni nebyla zveřejněna žádná jiná studie na „bílé“ populaci analyzující alelické, genotypové nebo haplotypové frekvence IL-8 variant u pacientů s parodontidou. Cílem naší práce bylo vyšetřit 4 SNPs v IL-8 genu (rs4073, rs2227307, rs2227306, rs2227532), jejich haplotypy u pacientů s CP/AgP a subgingivální bakteriální kolonizaci v české populaci.

Metodicky se jednalo o studii kontrol-případů, kdy bylo vybráno 278 pacientů s CP, 58 s AgP a 156 zdravých kontrol ze souboru pacientů vyšetřených na Parodontologickém oddělení Stomatologické kliniky, LF MU a FNUSA v Brně. Genotypizaci jsme provedli metodou real-time PCR s použitím 5' nukleázové TaqMan[®] assay pro alelické diskriminace u SNP. Jednotlivé TaqMan[®] sondy, které obsahují kromě dvou primerů také oligonukleotidové sekvence značené fluorescenčním barvivem VIC a FAM se specificitou pro konkrétní alelu genu, viz **Obrázek 6**²⁷⁹, jsme získali od společnosti Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Subgingivální bakteriální kolonizace byla analyzována DNA mikročipovým detekčním kitem v podskupině 247 osob.

Alelické ani genotypové frekvence všech zkoumaných IL-8 polymorfizmů se nelišily mezi skupinami pacientů s CP a/nebo AgP a kontrolami ($P > 0,05$). Nicméně -251A/+396T/+781T (2,0 % oproti 5,1 %, $P < 0,02$, $OR = 0,34$, $95\%CI: 0,15-0,78$) a -251T/+396G/+781C (2,0 % oproti 4,5 %, $P < 0,05$, $OR = 0,41$, $95\%CI: 0,18-0,97$) haplotypy byly významně méně časté u pacientů s CP než u kontrolní skupiny. Protože SNP IL-8 -845 téměř není v české populaci polymorfni (TT genotyp se vyskytl u 98,4 % pacientů CP a dokonce u 100 % kontrol a AgP pacientů), sledovali jsme ho jenom v podskupině 193 osob, a nebyl tudíž součástí haplotypové analýzy navržené dle práce od Scarel-Caminaga et al.²⁷²

U zdravých kontrolních osob (N=75) se v přítomnosti alely T ($P<0,02$) nebo TT genotypu ($P<0,05$) u SNP IL-8 +396G/T méně často vyskytovala bakterie *F. nucleatum*. V kontrastu s tím je zjištění, že nositelé IL-8 -251T alely měli zvýšené OR pro přítomnost *A. actinomycetemcomitans* u AgP pacientů (N=21) ($P<0,01$) a tato bakterie byla častěji detekována také v přítomnosti TT genotypu. U pacientů s CP (N=151) nesoucích CC genotyp IL-8 +781 byla méně často přítomna bakterie *T. forsythia* v jejich subgingivální mikroflóře než u jedinců s jiným genotypem ($P<0,05$). Nicméně, vztah mezi parodontálními bakteriemi a IL-8 genovými polymorfizmy musíme posuzovat velmi opatrně vzhledem k malému počtu jedinců v jednotlivých podskupinách.



Obrázek 6: Princip alelické diskriminace SNP při real-time PCR s použitím 5' nukleázové TaqMan® assay²⁷⁹

Asociace TGC haplotypu s CP byla potvrzena vztahem mezi TGC/TTC haplotypy (uspořádanými jako genotypy) a CP. Tyto výsledky nás utvrzují v předpokladu, že vyšetřování haplotypů má větší váhu při detekci rizikovosti/protektivity alel než analýza jednotlivých polymorfizmů. Naše výsledky se liší od nálezů Scarel-Caminaga et al., kteří asociovali ATC/TTC a AGT/TGC haplotypy s CP v brazilské populaci.²⁷² Tyto protichůdné

výsledky mohou být způsobeny variabilitou sledovaných populací i rozdíly ve frekvencích jednotlivých haplotypů mezi českou a brazilskou populací.

Výsledky mikrobiální analýzy a jejich propojení s variabilitou v IL-8 genu jsou v souladu s představou, že individuální genetická vnímavost může ovlivnit odpověď hostitele na infekci.²⁸⁰ Nibali et al. například prokázali souvislost mezi IL-6 SNPs a výskytem *A. actinomycetemcomitans* u pacientů s parodontitidou.^{281,282,283} Kromě toho, Finoti et al. zjistili, že se destrukce parodontálních tkání může vyskytnout u pacientů „geneticky náchylných k CP“ (např. při přítomnosti IL-8 ATC/TTC haplotypu) i při slabším mikrobiálním podnětu.¹⁶⁹

Ačkoli žádný ze sledovaných SNPs v genu pro IL-8 nebyl samostatně asociován s parodontitidou, některé haplotypy mohou mít protektivní vliv na rozvoj CP v české populaci. Klinický význam těchto zjištění je však malý vzhledem k velmi nízké frekvenci "ochranných" haplotypů. Limitací studie je také to, že jsme neměřili expresi genu pro IL-8 nebo hladiny jeho proteinu, a proto neznáme funkční důsledky zkoumaných polymorfizmů u námi vyšetřených pacientů.

5.4 Interleukin-18 - funkce proteinu, významné polymorfizmy v genu

Interleukin-18 (IL-18) objevený v roce 1995 a identifikovaný jako IFN- γ indukující faktor moduluje vrozenou i získanou imunitu.²⁸⁴ Je zapojen do aktivace TH1 imunitní odpovědi a zároveň inhibuje syntézu IgE, kdy obvykle působí synergicky s IL-12. IL-18 je pleiotropní cytokin stimulující produkci IL-4, IL-6, IL-13 a histaminu, což může vést k iniciaci TH2 odpovědi a produkci IgE.²⁸⁵ Protože sdílí strukturální vlastnosti s IL-1 β , patří IL-18 do rodiny IL-1 cytokinů.²⁸⁶ Oba cytokiny jsou produkovány jako inaktivní prekurzory, které se přeměňují na biologicky aktivní molekuly po reakci s enzymem kaspáza-1.²⁸⁷ Regulace exprese IL-18 byla dosud rozsáhle studována několika výzkumnými skupinami.^{288,289,290}

U kavkazské populace byly nalezeny zvýšené hladiny IL-18 v krevním séru nebo plazmě u pacientů s CP, nicméně koncentrace IL-18 v gingivální tkáni nebyly významně rozdílné mezi pacienty a kontrolními osobami.^{291,292} Již dříve bylo zjištěno, že *P. gingivalis* je schopna specificky stimulovat produkci a uvolňování aktivní formy IL-18 v lidských monocytárních THP-1 buňkách (progenitorové pomocné T-lymfocyty).²⁹³ Yoshinaka et al. zkoumali pomocí IL-18 transgenních myší po indukované orální infekci *P. gingivalis*, jak nadměrná exprese IL-18 souvisí s onemocněním parodontu. Došli k závěru, že při bakteriální infekci se zvyšují hladiny IL-18 v gingivální tkáních, což následně ovlivňuje rozvoj CP.²⁹⁴

Gen pro lidský IL-18 je lokalizován na chromozomu 11q22.2-q22.3^{284,295} a skládá se ze 6 exonů.²⁹⁶ V genu pro IL-18 bylo nalezeno několik různých polymorfizmů: v promotorové oblasti -607A/C (rs1946518), -137C/G (rs187238), a v intronu 1 -140 (dříve -133C/G, rs4988359). Noack et al. studovali SNPs -838A/C (rs1946518) a -368C/G (rs187238) u pacientů s AgP i s CP ve srovnání se zdravými kontrolami.^{297,298} Změna v pozici -607 genu pro IL-18 narušuje potenciální vazebné místo pro responsivní vazebný protein cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), zatímco alela C v promotorové oblasti v pozici -137 má vliv na vazbu nukleárního faktoru H4TF1. Je známo, že tyto dva promotorové polymorfizmy a jejich haplotypy ovlivňují expresi genu pro IL-18.^{299,300}

5.4.1 Interleukin-18 - metodika, výsledky a diskuze

Do naší studie kontrol-případů bylo zahrnuto 345 pacientů s CP a 291 zdravých kontrol (**Tabulka 1**). Sledovali jsme 3 polymorfizmy, -607A/C (rs1946518), -137C/G (rs187238) a -140 (rs4988359). U SNPs -607A/C (rs1946518) a -137C/G (rs187238) jsme využili alelově specifické PCR a postupovali jsme dle protokolu, který byl uveden v práci od Giedraitis et al.²⁹⁹

Tabulka 1: Interleukin-18 - demografický popis studovaných osob s chronickou parodontitidou (CP) a zdravých kontrol

Charakteristika	Kontroly	CP
	N=291	N=345
Věk (věkový průměr±SD)	48,22±11,02	50,83±8,49
Pohlaví (muži/ženy)	148/143	166/179

N=počet osob, SD=směrodatná odchylka

Pro analýzu SNP -140C/G (rs4988359) jsme zvolili a mírně upravili metodu PCR s následnou restriční analýzou enzymem *SmaI* (New England Biolabs) podle publikace od Kruse et al.³⁰¹ Sekvence primerů, velikosti fragmentů a používané restriční enzymy jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

Všechny studované SNPs v genu pro IL-18 byly u skupiny zdravých kontrol v Hardy-Weinbergově rovnováze. V alelických ani genotypových frekvencích jsme nenalezli statisticky významné rozdíly mezi kontrolními osobami a pacienty s CP ($P > 0,05$, **Tabulka 3**). Všechny varianty v IL-18 genu byly navzájem v různé míře v těsné vazbě (Lewontinův disekvilibrační koeficient (D'), $D' = 0,671-0,868$ u kontrol, $D' = 0,691-0,863$ u CP). Ani ve frekvencích haplotypů jsme neprokázali signifikantní rozdíly mezi kontrolami a pacienty s CP ($P > 0,05$, **Tabulka 4**).

Ze čtyř předchozích studií, které se zabývaly vlivem polymorfizmů v IL-18 genu na rozvoj CP nebo gingivitidy, se u 3 nepodařilo prokázat asociaci alelických či genotypových frekvencí s onemocněním parodontu^{298,302,303}, s čímž se shodují i výsledky našeho současného pozorování. Ačkoli ve studii od Vokurky et al. nebyly nalezeny významné rozdíly alelických a/nebo genotypových frekvencí IL-18 -607A/C varianty mezi dětmi s gingivitidou a zdravou dásní, autoři prokázali významnou asociaci složeného genotypu vytvořeného z IL-18 -607A/C a MMP-9 -1562C/T SNPs s gingivitidou, který tak může být považován za rizikový faktor pro rozvoj tohoto onemocnění u dětí.³⁰³

U destruktivní parodontitidy provedli Folwaczny et al. analýzu šesti polymorfizmů v genu pro IL-18 v pozicích -656, -607, -137, +113, +127 a v kodonu 35/3, přičemž nenalezli signifikantní rozdíly v genotypových frekvencích mezi zdravými kontrolami a pacienty s parodontitidou. Ani při následné haplotypové analýze, kdy byly kombinovány SNPs IL-18 -607A/C a -137C/G, autoři nenašli rozdíly mezi oběma skupinami ($P = 0,545$).³⁰² Práce

od Noack et al., která navazovala na jejich dřívější studii a sledovala polymorfizmy v promotorové oblasti IL-18 genu v pozici -838A/C a -368C/G společně s variabilitou v genu pro TLR-4 u pacientů s AgP a u zdravých kontrol, byla provedena také u pacientů s CP. Z obou studií vyplývá, že IL-18 ani TLR-4 varianty nemají významný vliv na rozvoj chronické nebo agresivní formy parodontitidy^{297,298}, s čímž korelují i výsledky našeho pozorování, kdy jsme nenašli spojitost studovaných SNPs v genu pro IL-18 s výskytem CP.

Pouze jedna dosud publikovaná studie od Martelli et al., která zkoumala dva polymorfizmy v promotorové oblasti IL-18 genu, prokázala asociaci AA genotypu v pozici -607 s výskytem CP a AC genotypu s AgP, přičemž také CG genotyp v pozici -137 byl rizikový pro rozvoj AgP. Získané výsledky naznačují, že určité alely a/nebo genotypy IL-18 genu mohou být rizikovými a „predisponovat“ k rozvoji jak AgP, tak i CP, nicméně autoři se domnívají, že SNPs IL-18 -607A/C a -137C/G nejsou vhodnými diagnostickými markery pro žádnou parodontitis.³⁰⁴

Naproti tomu, výsledky meta-analýzy 9 studií od Li et al. ukázaly, že C alela IL-18 -607A/C polymorfizmu, stejně jako C varianta IL-18 -137C/G může být asociována se zvýšeným rizikem parodontitidy. Zahrnuté studie zkoumaly jak asijskou, tak i kavkazskou populaci, a kromě variability v genu pro IL-18 sledovaly také plazmatické hladiny IL-18, které byly vyšší u pacientů s parodontitidou.³⁰⁵

Ačkoli tato studie kontrol-případů nepotvrdila významnou roli daných polymorfizmů v genu pro IL-18 pro vznik CP, je nyní připravována k odeslání.

Tabulka 2: Sekvence primerů, velikosti fragmentu a restriční enzymy použité při analýze jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18)^{299,301}

SNP	Sekvence primerů (5' → 3')	Restriční enzym	Velikost fragmentu (bp)
rs1946518 IL-18 -607A/C	specifický FW GTTGCAGAAAGTGTA AAAAATTATTA	-	specifický: 196 kontrolní: 301
	specifický FW GTTGCAGAAAGTGTA AAAAATTATTAC		
	kontrolní FW CTTTGCTATCATTCCAGGAA		
	REV TAACCTCAT TCAGGACTTCC		
rs187238 IL-18 -137C/G	specifický FW CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAC	-	specifický: 261 kontrolní: 446
	specifický FW CCCCAACTTTTACGGAAGAAAAG		
	kontrolní FW CCAATAGGACTGATTATCCGCA		
	REV AGGAGGGCAAATGCACTGG		
rs4988359 IL-18 -140C/G	FW GTATTCATAAGCTGAAACTCCCGG	<i>Sma</i> I	alela C: 265
	REV TGTTCCTATGGCATTAGCCTTAC		alela G: 243+22

Tabulka 3: Alelické a genotypové frekvence tří jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18) u kontrol a pacientů s chronickou parodontitidou (CP)

SNP	Genotypy Alely	Kontroly N=291 N (%)	CP N=345 N (%)	OR	95%CI
rs1946518 IL-18 -607A/C	AA	33	41	0,95	0,56-1,62
	AC	155	170	0,84	0,60-1,18
	CC	103	134	1,00	-
	A	221 (38,0)	252 (36,5)	0,94	0,75-1,18
	C	361 (62,0)	438 (63,5)	1,00	-
rs187238 IL-18 -137C/G	CC	23	24	0,86	0,47-1,59
	CG	122	144	0,97	0,70-1,35
	GG	146	177	1,00	-
	C	168 (28,9)	192 (27,8)	0,95	0,74-1,21
	G	414 (71,1)	498 (72,2)	1,00	-
rs498359 IL-18 -140C/G	CC	133	166	1,00	-
	CG	128	147	0,92	0,66-1,28
	GG	30	32	0,85	0,49-1,48
	C	394 (67,7)	479 (69,4)	1,00	-
	G	188 (32,3)	212 (30,6)	0,93	0,73-1,18

CI=interval spolehlivosti, N=počet osob, OR=poměr šancí

Tabulka 4: Haplotypové frekvence 3 jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18) u kontrol a pacientů s chronickou parodontitidou (CP)

			Kontroly N=291	CP N=345	OR	95%CI
IL-18 -607A/C IL-18 -137C/G IL-18 -140C/G	C	G	0,5483	0,5598	1,06	0,85-1,32
	A	C	0,2494	0,2223	0,87	0,67-1,13
	A	G	0,1035	0,1083	1,04	0,72-1,50
	C	G	0,0484	0,0278	0,57	0,31-1,06
	A	C	0,0157	0,0088	2,20	0,91-5,31
	C	C	0,0141	0,0299	1,92	0,83-4,45
	A	G	0,0111	0,0258	1,70	0,58-5,00
	C	C	0,0095	0,0173	0,65	0,24-1,76

Sestaveno sestupně dle frekvencí haplotypů u kontrolních subjektů (aditivní model)

CI=interval spolehlivosti, N=počet osob, OR=poměr šancí

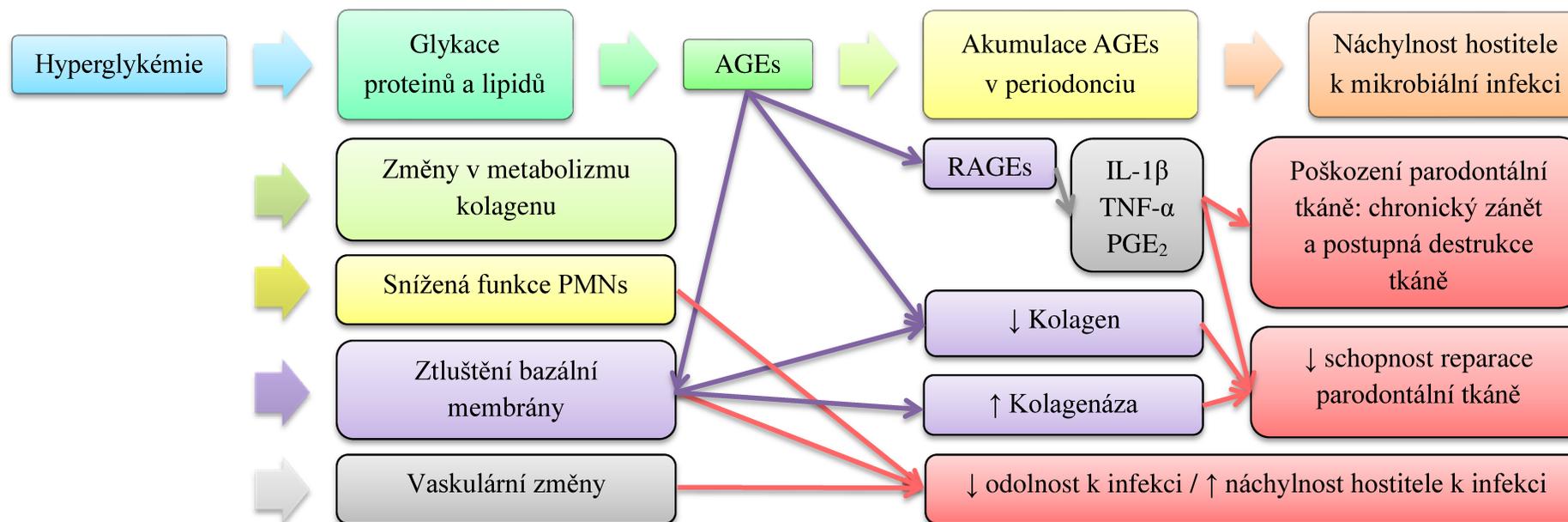
5. B. Parodontitida a diabetes mellitus v publikaci „Diabetes mellitus a orální zdraví“

Mezi diabetem a chronickou parodontitidou byl nalezen reciproční vztah, kdy hyperglykémie akceleruje rozvoj parodontitidy, a ta následně vede ke zhoršení kontroly glykémie. Takovýto obousměrný vztah mezi dvěma chorobnými stavy vytváří klasický „circulus viciosus“ s četnými patofyziologickými a terapeutickými konsekvencemi.³⁰⁶

Pravděpodobně v důsledku rozdílné imuno-/zánětlivé reaktivity na bakteriální osídlení parodontu při hyperglykémii se přibližně 3krát riziko zvyšuje vzniku parodontitidy u diabetiků ve srovnání s nediabetickou populací.³⁰⁷ Podobně jako u jiných komplikací DM jsou pozorovány značné interindividuální rozdíly v rychlosti nástupu, progresi a rozsahu postižení parodontu u diabetiků.³⁰⁸ Obecně se předpokládá, že různý stupeň náchylnosti, resp. rezistence, je přinejmenším z části geneticky determinován. Na **Obrázku 7** je znázorněn mechanismus, kterým může DM ovlivňovat stav parodontu, a na **Obrázku 8** je naopak znázorněn možný vliv parodontitidy na onemocnění DM.³⁰⁹

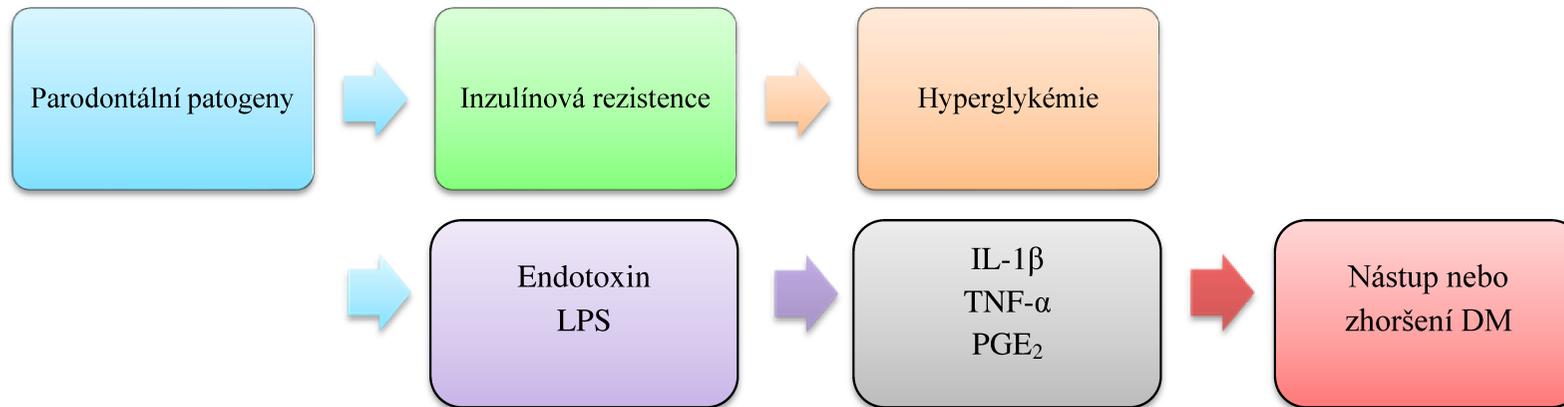
Podrobněji je vztah mezi parodontitidou a DM nastíněn v přehledovém článku uvedeném v **Příloze 4** s názvem „Diabetes mellitus a orální zdraví“, který byl přijat k publikaci v roce 2014 do časopisu Česká Stomatologie a jehož jsem spoluautorkou.¹⁷¹

Diabetes mellitus → onemocnění parodontu



Obrázek 7: Mechanismus, kterým diabetes mellitus (DM) může ovlivňovat tkáň parodontu.³⁰⁹ U pacientů s DM může chronická hyperglykémie vést k akceleraci tvorby produktů pokročilé glykace (AGEs), které jsou rozpoznávány specifickými receptory pro AGEs (RAGEs) lokalizovaných na povrchu endoteliálních buněk a monocytů. Interakce makrofágů s AGEs iniciuje produkci prozánětlivých mediátorů, jako je tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) a prostaglandin E₂ (PGE₂).³¹⁰ Kromě toho může mít DM na parodontální tkáň vliv díky rozvoji vaskulárních abnormalit, neenzymatické glykosylaci, poruch metabolismu lipidů, změnám v metabolismu kolagenu, neutrofilní dysfunkci (PMNs, polymorfonukleární leukocyty) a změnám v monocytární odpovědi.³⁰⁷

Onemocnění parodontu → Diabetes mellitus



Obrázek 8: Mechanismus, kterým parodontitida může ovlivňovat diabetes mellitus (DM).³⁰⁹ Je známo, že akutní bakteriální a virové infekce zhoršují inzulínovou rezistenci u lidí bez DM. U pacientů s DM pak tento stav dále zhoršuje kontrolu glykémie. Chronické Gram negativní (G-) parodontální infekce mohou zvyšovat inzulínovou rezistenci a zhoršovat kontrolu glykémie. Lipopolysacharid (LPS) produkovaný *Porphyromonas gingivalis* je potenciálním induktorem prozánětlivých cytokinů, jakými jsou tumor nekrotizující faktor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) a prostaglandin E₂ (PGE₂), jejichž zvýšená koncentrace zrychluje nástup DM a/nebo zhoršuje stav pacientů s DM.³¹⁰

5.5 Interleukin-1- hladiny proteinu a významné genové polymorfizmy ve vztahu k parodontitidě a DM

Funkce proteinu a popis genu, který kóduje tento pluripotentní cytokin, je společně s jeho významnými polymorfizmy uveden v **kapitole 4.1**.

U pacientů s parodontitidou byly v gingivální tkáni nalezeny zvýšené hladiny IL-1 α a IL-1 β .³¹¹ Hypotézu o vlivu hyperglykémie na stupeň zánětlivé odpovědi u parodontitidy potvrdila studie na krysím modelu, jejíž výsledky naznačují, že DM může vést ke zvýšené produkci IL-1 β , TNF- α a LPS v parodontálních tkáních.³¹² Bylo zjištěno, že IL-1 β a TNF- α mohou ovlivňovat inzulínovou rezistenci a poškození β -buněk pankreatu.³¹³ Významně vyšší hladiny IL-1 β v GCF vykazovali pacienti s T1DM³¹⁴, ale i pacienti s T2DM s CP (ve srovnání s nediabetickými kontrolami).^{315,316} Navíc Aspriello et al. zjistili, že hladiny IL-1 β u pacientů s parodontitidou a T1DM jsou ovlivněny dobou trvání DM.³¹⁷ Engebretson et al. asociovali IL-1 β hladiny v GCF se špatnou kontrolou glykémie u T2DM a pacientů s CP.³¹⁸ Protektivní role je pak přisuzována IL-1RA, jehož vyšší exprese ve slinách byla pozorována u pacientů s T2DM a zdravým parodontem.³¹⁹ U potomků pacientů s T2DM jsou hladiny IL-1RA považovány za nejcitlivější marker odpovědi cytokinů na prediabetický stav.³²⁰

Genotypové frekvence IL-1A -889C/T (rs1800587), IL-1B +3953C/T (rs1143634) a IL-1RN 86 bp VNTR v intronu 2 a současně i produkce příslušných proteinů byly asociovány s CP v čínské populaci, kde IL-1A -889CC, IL-1B +3953CC a IL-1RN22 genotypy mohou být považovány za rizikové ukazatele pro rozvoj CP.³²¹ Oproti tomu v libanonské populaci jsou se zvýšeným rizikem parodontitidy spojovány genotypy IL-1A -889TT nebo IL-1B +3953TT.³²² Meta-analýza od Mao et al. se zabývala 23 studiemi kontrol-případů a došla k závěru, že variabilita v IL-1A -899C/T SNP (rs1800587, který odpovídá označení -899C/T a +4845C/T) ovlivňuje riziko vzniku CP.³²³ Do meta-analýzy od Deng et al. bylo zařazeno 36 studií, z jejichž výsledků vyplývá, že existují zřejmé důkazy o asociaci SNP IL-1B +3953C/T a CP.³²⁴ Avšak ne ve všech populacích se podařilo asociaci polymorfizmů v IL-1A, IL-1B s CP potvrdit.^{325,326} Také u pacientů s AgP nebyla nalezena spojitost rizika rozvoje tohoto onemocnění s IL-1A -889C/T³²⁷ a ani s IL-1B +3953(4)C/T genovým polymorfizmem.^{328,329}

V hodnocení genotypů se používá také často tzv. „double genotyp“ složený z IL-1A -889C/T a IL-1B +3953C/T SNPs, u kterého Kornman et al. našli 7krát vyšší riziko vzniku CP u dospělých nekuřáků v kavkazské populaci než u zdravých pacientů.¹⁰² Složený genotyp byl

poté studován v souvislosti s kouřením, které je považováno za hlavní rizikový faktor onemocnění parodontu, a výsledky naznačují, že i při pozitivním genotypu nekuřáci zvýšenému riziku rozvoje parodontitidy vystaveni nejsou.³³⁰

Po analýze vícero obdobných prací, Huynh-Ba et al. došli k závěru, že neexistují dostatečné důkazy pro tvrzení, že pozitivní IL-1 „double genotyp“ přispívá k progresi parodontitidy a/nebo k úspěšnosti léčby.³³¹ Kontroverzní závěry vyplývají z meta-analýzy 53 studií vytvořené použitím metod náhodného efektu, která našla statisticky významnou souvislost složeného genotypu IL-1A -889C/T a IL-1B +3953C/T s chronickým onemocněním parodontu. Nicméně v této práci Nikolopoulos et al. neprokázali asociaci SNPs IL-1A -889C/T a +4848G/T, IL-1B +3953(4)C/T s AgP ani s CP, kromě marginální asociace polymorfizmu IL-1B -511C/T s CP.³³²

Také v případě asociace VNTR polymorfizmu v IL-1RN s parodontitidou byly publikovány studie s kontroverzními výsledky; v čínské a turecké populaci je za rizikovou alelu považována ta, která obsahuje 2 repetice^{321,333}, zatímco v Jordánské populaci byla za rizikovou označena alela se 4 repeticemi.³²⁶ Dle výsledků meta-analýzy od Ding et al. lze usuzovat, že IL-1RN 86 bp VNTR polymorfizmus by mohl přispět k zvýšení rizika CP, a také ke snížení rizika AgP.³³⁴

V indické populaci byly alela 2 nebo IL-1RN22 genotyp spojeny se zvýšeným rizikem rozvoje T2DM.^{89,335} Krikovsky et al. asociovali IL-1B polymorfizmus s T1DM u dětí.³³⁶ Genetická variabilita v IL-1A -889C/T (rs1800587) a IL-1B +3953C/T (rs1143634) může být genderově specificky asociována s rizikem vzniku T2DM.³³⁷ Existují také další studie provedené v různých diabetických populacích u pacientů s T2DM v kontextu s parodontitidou a variabilitou IL-1 genového klasteru.^{338,339,340}

5.5.1 Interleukin-1 - metodika, výsledky a diskuze

Do této studie kontrol-případů bylo zahrnuto 924 osob; jednalo se o zdravé kontroly, pacienty s CP a pacienty s T1DM nebo T2DM s/bez CP. Demografický popis studované kohorty je uveden v **Tabulce 5**. Pacienti byli vyšetřeni na Parodontologickém oddělení Stomatologické kliniky FNUSA v Brně a/nebo na diabetologických, příp. nefrologických pracovištích v Brně. Pro zařazení do podskupiny s DM a současně CP museli mít pacienti alespoň 16 zubů a diagnostikovaný DM nejméně 5 let. Pro haplotypovou analýzu jsme zvolili dva SNPs v IL-1 genovém klasteru (IL-1A -889C/T (rs1800587) a IL-1B +3953C/T (rs1143634)) a VNTR polymorfizmus ve 2. intronu genu pro IL-1RN. Varianty alel u IL-1RN VNTR polymorfizmu

jsou uvedeny v **kapitole 4.1**.⁷³ Získání DNA ze vzorků a genotypizace pacientů proběhla dle postupů obsažených v naší dříve uveřejněné práci uvedené v **kapitole 4.1.2**.⁷⁹

Tabulka 5: Interleukin-1 - demografický popis studovaných osob s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol

Charakteristika	Kontroly	CP	T1DM	T2DM	T1DM+CP	T2DM +CP
Věk (věkový průměr±SD)	51,8±11,0	53,3±7,8	44,8±15,6	67,5±10,6	49,7±12,3	64,5±9,2
Pohlaví (muži/ženy)	115/111	112/122	54/40	154/152	12/11	21/20
Kouření ne/ano (%)	72,6/27,4	70,0/30,0	*	*	78,3/21,7	87,5/12,5

N=počet osob, SD=směrodatná odchylka, *nezjištěno

Výsledky alelických a genotypových frekvencí jsou uvedeny v **Tabulce 6**. Neprokázali jsme statisticky významnou asociaci alelických ani genotypových frekvencí IL-1A -889C/T SNP, ale našli jsme rozdíly ve frekvencích alel IL-1B +3953C/T mezi zdravými kontrolami a pacienty s CP (P<0,02). Mezi těmito dvěma skupinami jsme zaznamenali také signifikantní rozdíl v genotypových frekvencích IL-1RN VNTR (P<0,05). Zdravé kontroly a pacienti s T1DM se rovněž lišili ve frekvencích genotypů, ale i alel IL-1RN VNTR (P<0,01). Významný rozdíl v tomto genotypu byl patrný i při porovnání pacientů s T1DM a CP oproti kontrolním osobám (P<0,02). Při porovnání alelických frekvencí IL-1RN u pacientů s T1DM vs. T2DM jsme zaznamenali také signifikantní difference (P=0,03). Rozdíl ve frekvenci tzv. "double" genotypu“ složeného z IL-1α -889C/T a IL-1β +3953C/T SNPs nebyl mezi jednotlivými skupinami statisticky významný.

V **Tabulce 7** je zobrazena párová vazebná analýza (LD=vazebná nerovnováha) pro všechna srovnání mezi třemi polymorfizmy v IL-1 genovém klasteru u pacientů CP, T1DM a T2DM s/bez CP a zdravých kontrol.

Pro haplotypovou analýzu jsme alely s více než 2 repeticemi označili IL-1RN*L (dlouhá alela) a alelu se 2 repeticemi jako IL-1RN*S (krátká alela).⁷³ Výsledky haplotypové analýzy, které jsou uvedeny v **Tabulce 8**, ukazují, že s rizikem CP je asociován haplotyp TTL (P<0,03, OR=0,69, 95%CI=0,496-0,954) a s T1DM jsou spojeny dokonce 3 haplotypy a to CCS (P<0,01, OR=0,51, 95%CI=0,317-0,805), TCL (P<0,01, OR=2,26, 95%CI=1,242-4,126) a CTL (P<0,04, OR=2,324, 95%CI=1,071-5,045). CCL haplotyp jsme shledali marginálně rizikový (P=0,064, OR=1,56, 95%CI=0,972-2,504) u pacientů s T2DM s CP, stejně tak jako

CTL haplotyp ($P=0,09$, $OR=2,98$, $95\%CI=0,938-9,461$) u pacientů s T1DM s CP ve srovnání se zdravými osobami.

Asociaci samotného IL-1A -889C/T (rs1800587) polymorfizmu s CP v české populaci jsme neprokázali podobně jako řada dalších studií u populací z UK³⁴¹, Řecka³⁴² a Španělska.³⁴³ Naše výsledky jsou naproti tomu v rozporu s prací od Wagner et al., která studovala německou populaci.³⁴⁴ Kromě toho jsme ani u pacientů s diabetem mellitem s/bez parodontitidy nenalezli významnou souvislost se SNP v IL-1A -889C/T. Dosud nebyla publikována práce zabývající se tímto polymorfizmem u pacientů s T1DM, nicméně u pacientů s T2DM byla varianta v pozici -889 IL-1A, konkrétně alela T, asociována s vyšším rizikem T2DM u mužů, zatímco u žen měla tato minoritní alela opačný, tedy protektivní, ale rovněž signifikantní efekt.³³⁷

Polymorfizmus IL-1B +3953C/T (rs1143634) může hrát roli v etiopatogenzi CP v české populaci, kdy se alela T jeví jako protektivní. A ačkoliv byl již tento SNP v meta-analýze od Deng et al., která zahrnovala 36 studií v různých populacích, spojen s výskytem CP, na rozdíl od naší práce měli nositelé T alely 1,33krát vyšší riziko rozvoje CP než nositelé C alely.³²⁴ U pacientů s diabetem mellitem s/bez CP jsme pak neprokázali významný vztah mezi studovaným IL-1B polymorfizmem, ačkoli Krikovsky et al. označili T alelu u SNP IL-1B +3953(4) za rizikovou u dětí s T1DM.³³⁶ Obdobně jako v případě IL-1A -889C/T polymorfizmu u pacientů s T2DM může být asociace varianty v IL-1B SNP (rs1143634) s rizikem vzniku T2DM genderově specifická, neboť alela T představuje vyšší riziko rozvoje T2DM u mužů.³³⁷ Stejní autoři alelu T v pozici +3953 IL-1B genu asociovali již dříve s vyšší koncentrací glukózy v krvi u pacientů s DM.³⁴⁵ Struch et al. ve své studii uvádějí, že pacienti s T2DM mají zvýšené riziko CP, které se zhoršuje ještě při určité kombinaci variant IL-1A/1B genotypu.³³⁹ Guzman et al. našli marginální vztah mezi polymorfizmem v pozici +3953C/T IL-1B genu a výskytem parodontitidy v diabetické populaci.³³⁸

S našimi výsledky korespondují pozorování v chilské populaci, kdy López et al. neprokázali významné rozdíly v alelických ani genotypových frekvencích polymorfizmů IL-1A -889C/T, IL-1B +3953C/T a IL-1RN VNTR mezi pacienty s T2DM a současně s CP a pacienty bez diabetu mellitu, potvrdili pouze vztah TT genotypů u IL-1A -889 a IL-1B +3953 s výskytem CP.³⁴⁰

IL-1 α a IL-1 β prozánětlivý potenciál musí být regulován endogenními inhibitory, jakými je např. IL-1RA. V naší studii jsme zjistili významný vztah mezi variantami IL-1RN (VNTR, 86 bp v intronu 2) a T1DM ($P<0,01$). Signifikantní rozdíly v genotypových frekvencích byly

pozorovány i u pacientů s CP ($P < 0,05$) a u pacientů s T1DM v kombinaci s CP ve srovnání se zdravými osobami ($P < 0,02$). Krátká alela IL-1RN*S byla asociována s výskytem T1DM v české populaci ($P < 0,01$), naproti tomu v egyptské populaci byla frekvence této alely a genotypu tvořeného kombinací těchto dvou alel, tj. IL-1RN22, nižší u pacientů s T1DM ve srovnání se zdravými kontrolami.³⁴⁶ V indické populaci tuto krátkou alelu obsahující dvě 86 bp repetice v IL-1RN genu společně s IL-1RN22 genotypem asociovali s rizikem rozvoje T2DM.^{89,335} Výše uvedené rozdíly mohou být dány variabilitou mezi populacemi. Naše výsledky naznačují, že polymorfismus v IL-1RN může být jedním z klíčových faktorů v patogenezi DM u českých pacientů.

Při porovnání haplotypových frekvencí se haplotyp TTL, složený z IL-1A -889C/T, IL-1B+3953C/T a IL-1RNS/L VNTR, zdá být protektivní k rozvoji CP. U pacientů s T1DM můžeme označit jako rizikové haplotypy TCL a CTL, zatímco CCS byl spojen s nižším rizikem rozvoje T1DM. CTL haplotyp byl u skupiny T1DM pacientů s CP pouze marginálně rizikový, což je ve shodě s výsledky u pacientů s T1DM bez CP. Důvodem těchto nevýznamných rozdílů může být příliš nízký počet vyšetřených pacientů s T1DM a současně CP, proto je nutné tuto podskupinu rozšířit. Stejně tak v případě podskupiny pacientů s T2DM s CP uvažujeme o jejím rozšíření, neboť zde se haplotyp CCL jeví jako marginálně rizikový. Limitací naší studie je tedy počet pacientů s DM a současně s CP, což je důsledek relativně přísných kritérií, která pro zařazení do této podskupiny dodržujeme.

Závěrem lze říci, že některé alely a/nebo genotypy v IL-1B a IL-1RN genech mohou ovlivňovat rozvoj CP, T1DM s/bez CP v české populaci. Současně také specifické haplotypy IL-1 genového klasteru mohou hrát roli při rozvoji CP a T1DM. Pro zhodnocení protektivity nebo rizikovosti jednotlivých haplotypů u diabetických pacientů s CP je nutné rozšířit studovaný soubor v daných podskupinách.

Tabulka 6: Interleukin-1 genotypové a alelické frekvence u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol. CI=interval spolehlivosti, L/S=dlouhá/krátká alela, N=počet osob, OR=poměr šancí, *P<0.05 hladina významnosti (bez korekce na mnohonásobné srovnání), #nepočítáno pro malý počet osob ve skupinách

Genotypy	Kontroly	CP	OR (95% CI)	T1DM	OR (95% CI)	T2DM	OR (95% CI)	T1DM +CP	OR (95% CI)	T2DM +CP	OR (95% CI)
Alely	N=226	N=234		N=94		N=306		N=23		N=41	
IL-1α -889	N (%)	N (%)		N (%)		N (%)		N (%)		N (%)	
CC	105 (46,5)	125 (53,4)	1,00	41 (43,6)	1,00	152 (49,7)	1,00	11 (47,8)	1,00	22 (53,7)	1,00
CT	103 (45,6)	94 (40,2)	0,77 (0,52-1,12)	47 (50,0)	1,17 (0,71-1,93)	126 (41,2)	0,85 (0,59-1,21)	11 (47,8)	1,02 (0,42-2,45)	16 (39,0)	0,74 (0,37-1,49)
TT	18 (8,0)	15 (6,4)	0,70 (0,34-1,36)	6 (6,4)	0,85 (0,32-2,30)	28 (9,2)	1,07 (0,57-2,04)	1 (4,3)	0,53 (0,06-4,36)	3 (7,3)	0,80 (0,22-2,94)
C alela	313 (69,2)	344 (73,5)	1,00	129 (68,6)	1,00	430 (70,3)	1,00	33 (71,7)	1,00	60 (73,2)	1,00
T alela	139 (30,8)	124 (26,5)	0,81 (0,61-1,08)	59 (31,4)	1,03 (0,71-1,49)	182 (29,7)	0,95 (0,73-1,24)	13 (28,3)	0,89 (0,45-1,74)	22 (26,8)	0,83 (0,49-1,40)
IL-1β +3953	N (%)	N (%)		N (%)		N (%)		N (%)		N (%)	
CC	115 (50,9)	144 (61,5)	1,00	55 (58,5)	1,00	170 (55,6)	1,00	11 (47,8)	1,00	27 (65,9)	1,00
CT	95 (42,0)	78 (33,3)	0,66 (0,45-0,97)	31 (33,0)	0,68 (0,41-1,14)	113 (36,9)	0,80 (0,56-1,15)	10 (48,3)	1,10 (0,45-2,70)	12 (29,3)	0,54 (0,26-1,12)
TT	16 (7,1)	12 (5,1)	0,60 (0,27-1,32)	8 (8,5)	1,05 (0,42-2,59)	23 (7,5)	0,97 (0,49-1,92)	2 (8,7)	1,31 (0,27-6,44)	2 (4,9)	0,53 (0,12-2,46)
C alela	325 (71,9)	366 (78,2)	1,00	141 (75,0)	1,00	453 (74,0)	1,00	32 (69,6)	1,00	66 (80,5)	1,00
T alela	127 (28,1)	102 (21,8)*	0,71 (0,53-0,96)	47 (25,0)	0,85 (0,58-1,26)	159 (26,0)	0,90 (0,68-1,18)	14 (30,4)	1,12 (0,58-2,17)	16 (19,5)	0,62 (0,35-1,11)
IL-1RN (VNTR)	N (%)	N (%)		N (%)		N (%)		N (%)		N (%)	
11	109 (48,2)	105 (44,9)	1,00	64 (68,1)	1,00	172 (56,2)	1,00	13 (56,5)	1,00	22 (53,6)	1,00
12	87 (38,5)	99 (42,3)*	1,18 (0,80-1,75)	20 (21,3)*	0,39 (0,22-0,70)	104 (34,0)	0,76 (0,52-1,10)	5 (21,7)*	0,48 (0,17-1,40)	12 (29,3)	0,68 (0,32-1,46)
13	8 (3,5)	0	0,14 (0,02-1,12)	0	0,21 (0,03-1,74)	2 (0,6)	0,16 (0,03-0,76)	0	1,05 (0,12-9,06)	0	0,62 (0,07-5,21)
14	3 (1,3)	8 (3,4)	2,77 (0,71-10,72)	3 (3,2)	1,70 (0,33-8,69)	5 (1,6)	1,06 (0,25-4,51)	1 (4,3)	2,79 (0,27-28,87)	3 (7,3)	4,95 (0,94-26,18)
22	17 (7,5)	15 (6,4)	0,92 (0,44-1,93)	6 (6,4)	0,60 (0,23-1,60)	22 (7,2)	0,82 (0,42-1,61)	2 (8,7)	0,99 (0,20-4,76)	3 (7,3)	4,95 (0,94-26,18)
23	0	1 (0,4)	1,04 (0,06-16,81)	0	#	0	#	1 (4,3)	#	0	#
24	2 (0,9)	5 (2,1)	2,60 (0,49-13,67)	1 (1,1)	0,85 (0,08-9,58)	1 (0,3)	0,32 (0,03-3,54)	1 (4,3)	#	1 (2,4)	2,48 (0,22-28,53)
16	0	1 (0,4)	#	0	#	0	#	0	#	0	#
L alela	329 (72,8)	333 (71,2)	1,00	155 (82,4)	1,00	463 (75,7)	1,00	35 (76,1)	1,00	63 (76,8)	1,00
S alela	123 (27,2)	135 (28,8)	1,08 (0,81-1,45)	33 (17,6)*	0,57 (0,37-0,87)	149 (24,3)	0,86 (0,65-1,14)	11 (23,9)	0,84 (0,41-1,71)	19 (23,2)	0,81 (0,46-1,40)

Tabulka 7: Párová vazebná analýza pro všechna porovnání mezi třemi polymorfizmy v interleukin-1 (IL-1) genovém klasteru u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol

	IL-1α -889C/T	IL-1β +3953C/T	IL-1RN VNTR
IL-1α -889C/T kontroly			
CP		0,7526	0,7516
T1DM		0,7391	0,4996
T2DM		0,7515	0,6189
T1DM+CP		0,7360	0,6055
T2DM+CP		0,7515	0,8167
IL-1β +3953C/T kontroly			
CP			0,7590
T1DM			0,7004
T2DM			0,6840
T1DM+CP			0,7452
T2DM+CP			0,7712

LD (vazebná nerovnováha) byla měřena s použitím Lewontinova disekvilibračního koeficientu (D')

Tabulka 8: Haplotypové frekvence v interleukin-1 (IL-1) genovém klasteru u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol. Haplotypy jsou uspořádány dle klesající haplotypové frekvence u zdravých kontrolních osob. Pro haplotypovou analýzu byly alely s více než 2 repeticemi označeny IL-1RN*L (dlouhá alela) a alela se 2 repeticemi jako IL-1RN*S (krátká alela).

			Kontroly	CP	T1DM	T2DM	T1DM+CP	T2DM+CP
			N=226	N=234	N=94	N=306	N=23	N=41
IL-1 α -889C/T	IL-1 β +3953C/T	IL-1RN (VNTR)						
C	C	L	0,4310	0,4798	0,4785	0,4516	0,4424	0,5487 ^{##}
C	C	S	0,2129	0,2131	0,1218*	0,1795	0,1796	0,1421
T	T	L	0,2057	0,1396*	0,1536	0,1716	0,1732	0,1590
T	C	L	0,0525	0,0573	0,1172*	0,0774	0,0499	0,0592
C	T	L	0,0342	0,0370	0,0806*	0,0590	0,0953 [#]	0,0136
T	T	S	0,0268	0,0404	0,0212	0,0203	0,0358	0,0196
T	C	S	0,0204	0,0297	0,0273	0,0298	0,0237	0,0426
C	T	S	0,0121	0,0030	-	0,0107	-	0,0151

[#]CCL haplotyp je marginálně rizikový (P=0,064, OR=1,56, 95%CI=0,972-2,504); ^{##}CTL haplotyp je marginálně rizikový (P=0,09, OR=2,98, 95%CI=0,938-9,461); *P<0,05 vs. kontrolní osoby (bez korekce pro mnohonásobné srovnání)

6. Závěr

Výzkumné cíle disertační práce byly splněny, jelikož jsme prokázali vztah některých polymorfizmů v genech pro imunoregulační faktory k vybraným onemocněním dutiny ústní v české populaci. Nicméně komplexní charakter těchto chorob vyžaduje další studium, ve kterém budou genetické analýzy navazovat na klinická, mikrobiologická a biochemická vyšetření.

Proto na souboru pacientů a zdravých kontrol vybraných z „poolu“ pacientů brněnské studie ELSPAC nyní probíhají další genetické analýzy, pro které jsme vybrali varianty v genech pro receptor sladké chuti-1 (TAS1R) a glukózový transportér-2 (GLUT2). Konkrétně pak polymorfizmy TAS1R2 (rs35874116) a GLUT2 (SLC2A2) (rs5400), které byly v nedávné studii asociovány s rizikem vzniku zubního kazu v kanadské populaci.³⁴⁷

Také na studovaném souboru pacientů s EARR a zdravých kontrol po ortodontické léčbě probíhají další genetické analýzy. Pozornost jsme soustředili na gen pro VDR, jehož protein ovlivňuje odontogenezi i tvorbu kosti a současně má též roli v ovlivnění imunitní odpovědi.³⁴⁸

Pro haplotypovou analýzu jsme vybrali 5 SNPs ve VDR genu (*CdxI*, *TaqI*, *ApaI*, *BsmI*, *FokI*), přičemž *TaqI* polymorfizmus byl v relativně recentní studii asociován s EARR u pacientů po ortodontické léčbě v brazilské populaci.³⁴⁹

V současnosti dokončujeme genotypizace pacientů s parodontitidou v genech pro receptor IL-8 (CXCR2) a IL-10. Nově jsme se začali věnovat problematice kostní remodelace: SNPs ve VDR genu dle publikace od Baldini et al. provedené na kavkazské populaci³⁵⁰ a v OPG genu. Ačkoliv se v práci od Wagner et al., která studovala kavkazskou populaci, nepodařilo asociovat polymorfizmy v OPG genu s CP³⁴⁴, v asijské populaci byla prokázána souvislost vybraných SNPs v OPG genu s parodontitidou.³⁵¹ Na základě práce od Antonoglou et al., která popisuje korelaci hladin 1,25-dihydroxyvitaminu D v krevním séru se stavem parodontu u pacientů s T1DM v kavkazské populaci³⁵², jsme se rozhodli stanovit pomocí metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) hladiny metabolitů vitamínu D v krevní plazmě u souboru pacientů s CP, diabetiků s/bez CP a zdravých kontrol.

Aktuálně je pro nás prioritním cílem dokončení genetické analýzy v IL-1 genovém klasteru u rozšířeného souboru pacientů s DM a současně CP, protože dosavadní výsledky naznačují rizikovost určitých haplotypů u této podskupiny pacientů. Poté plánujeme sepsání publikace o vlivu těchto polymorfizmů na onemocnění CP, T1DM nebo T2DM a jejich kombinací v české populaci.

7. Soupis literatury a pramenů

1. Slezák R, Ivančáková R. Infekce ústní sliznice. *Med Pro Praxi*. 2006;6:288-290.
2. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):547-558.
3. Meurman JH. Oral infections may kill. *Dent Trib*. 2006;4(7/8):1-3.
4. Krejsek J, Kopecký O. *Klinická imunologie*. Pardubice, Czechia: NUCLEUS HK[®]; 2004.
5. Nečas E, Šulc K, Vokurka M. *Patologická fyziologie orgánových systémů část II*. 2nd ed. Praha, Czechia: Karolinum; 2009.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-144.
7. Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2002;29:10-21.
8. Cawson RA, Odell EM. *Cawson's essential of oral pathology and oral medicine*. 7th ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2002.
9. Wang X, Shaffer JR, Weyant RJ, Cuenco KT, Desensi RS, Crout R, McNeil DW, Marazita ML. Genes and their effects on dental caries may differ between primary and permanent dentitions. *Caries Res*. 2010;44:277-284.
10. Werneck RI, Mira MT, Trevilatto PC. A critical review: an overview of genetic influence on dental caries. *Oral Dis*. 2010;16(7):613-623.
11. Azevedo LF, Pecharki GD, Brancher JA, Cordeiro CA Jr, Medeiros KG, Antunes AA, Arruda ES, Werneck RI, de Azevedo LR, Mazur RF, Moysés SJ, Moysés ST, Faucz FR, Trevilatto PC. Analysis of the association between lactotransferrin (LTF) gene polymorphism and dental caries. *J Appl Oral Sci*. 2010;18(2):166-170.
12. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1997;111(3):301-309.
13. Michalowicz BS. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*. 1994;65:479-488.
14. Vijayalakshmi R, Geetha A, Ramakrishnan T, Emmadi P. Genetic polymorphisms in periodontal diseases: an overview. *Indian J Dent Res*. 2010;21(4):568-574.

15. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012;55(1):21-31.
16. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):738-748.
17. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol*. 2001;6(1):125-137.
18. Seppälä B, Ainamo J. A site-by-site follow-up study on the effect of controlled versus poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*. 1994;21(3):161-165.
19. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol*. 1998;69(1):76-83.
20. Slayton RL, Cooper ME, Marazita ML. Tuftelin, *mutans streptococci*, and dental caries susceptibility. *J Dent Res*. 2005;84(8):711-714.
21. Tahmourespour A, Kermanshahi RK. The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral *Streptococci*. *Bosn J Basic Med Sci*. 2011;11:37-40.
22. Weber T. *Memorix zubního lékařství*. 2nd ed. Praha, Czechia: Grada Publishing, a.s.; 2012.
23. Wotke J. *Patologie orofaciální oblasti*. Praha, Czechia: Grada Publishing, spol. s r.o.; 2001.
24. Johnston L, Vieira AR. Caries experience and overall health status. *Oral Health Prev Dent*. 2014. doi: 10.3290/j.ohpd.a31670. Accessed April 10, 2014.
25. Shaffer JR, Wang X, Feingold E, Lee M, Begum F, Weeks DE, Cuenco KT, Barmada MM, Wendell SK, Crosslin DR, Laurie CC, Doheny KF, Pugh EW, Zhang Q, Feenstra B, Geller F, Boyd HA, Zhang H, Melbye M, Murray JC, Weyant RJ, Crout R, McNeil DW, Levy SM, Slayton RL, Willing MC, Broffitt B, Vieira AR, Marazita ML. Genome-wide association scan for childhood caries implicates novel genes. *J Dent Res*. 2011;90(12):1457-1462.
26. Rudney JD, Michalowicz BS, Krig MA, Kane PK, Pihlstrom BL. Genetic contributions to saliva protein concentrations in adult human twins. *Arch Oral Biol*. 1994;39:513-517.
27. Zakhary GM, Clark RM, Bidichandani SI, Owen WL, Slayton RL, Levine M. Acidic proline-rich protein Db and caries in young children. *J Dent Res*. 2007;86:1176-1180.

28. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent*. 2011; Article ID 953412, 13 pages. doi: 10.1155/2011/953412. Accessed April 16, 2014.
29. Stenudd C, Nordlund A, Ryberg M, Johansson I, Källestål C, Strömberg N. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res*. 2001;80(11):2005-2010.
30. Sánchez L, Calvo M, Brock JH. Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*. 1992;67(5):657-661.
31. Spik G, Montreuil J. The role of lactotransferrin in the molecular mechanisms of antibacterial defense. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1983;19:123-130.
32. Kim SJ, Yu DY, Pak KW, Jeong S, Kim SW, Lee KK. Structure of the human lactoferrin gene and its chromosomal localization. *Mol Cells*. 1998;8:663-668.
33. Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, Fine DH. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun*. 2003;71:6141-6147.
34. Volčková M, Bořilová Linhartová P, Trefná T, Vlažný J, Musilová K, Kukletová M, Kukla L, Izakovičová Hollá L. Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries. *Caries Res*. 2014;48:19-44.
35. National Center for Biotechnical Information. SNP rs1126478. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1126478. Accessed July 1, 2011.
36. Videm V, Dahl H, Valberg LE, Wiseth R. Functional polymorphisms in the LTF gene and risk of coronary artery stenosis. *Hum Immunol*. 2012;73:554-559.
37. Ne RF, Witherspoon DE, Gutmann JL. Tooth resorption. *Quintessence Int*. 1999;30(1):9-25.
38. Andreasen JO. External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics, periodontics, orthodontics and endodontics. *Int Endod J*. 1985;18(2):109-118.
39. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod*. 2002;72:175-179.
40. Hartsfield JK Jr, Everett ET, AL-Qawasmi RA. Genetic factors in external apical root resorption and orthodontic treatment. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15:115-122.

41. Rudolph CE. A comparative study in root resorption in permanent teeth. *J AM Dent Assoc.* 1936;23:822-826.
42. Harris EF, Butler ML. Patterns of incisor root resorption before and after orthodontic correction in cases with anterior open bites. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1992;101:112-119.
43. Harris EF, Robinson QC, Woods MA. An analysis of causes of apical root resorption in patients not treated orthodontically. *Quintessence Int.* 1993;24:417-428.
44. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993;103:138-146.
45. Blake M, Woodside DG, Pharoah MJ. A radiographic comparison of apical root resorption after orthodontic treatment with the edgewise and Speed appliances. *Amer J Orthodont dentofacial Orthop.* 1995;108(1):76-84.
46. Levander E, Nalngren O, Stenback K. Apical root resorption during orthodontic treatment of patients with multiple aplasia: study of maxillary incisors. *Eur J Orthodont.* 1998;20(4):427-434.
47. Owman-Moll P, Kurol J. Root resorption after orthodontic treatment in high- and low-risk patients: analysis of allergy as possible predisposing factor. *Eur J Orthodont.* 2000;22(6):657-663.
48. Brezniak N, Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: the clinical aspects. *Angle Orthod.* 2002;72:180-184.
49. Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod.* 1975;67:522-539.
50. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111:301-309.
51. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-159.
52. Quinn JM, Saleh H. Modulation of osteoclast function in bone by the immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;310(1-2):40-51.
53. Hartsfield JK Jr. Pathways in external apical root resorption associated with orthodontia. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(3):236-242.

54. Pereira S, Lavado N, Nogueira L, Lopez M, Abreu J, Silva H. Polymorphisms of genes encoding P2X7R, IL-1B, OPG and RANK in orthodontic-induced apical root resorption. *Oral Dis*. 2013. doi: 10.1111/odi.12185. Accessed April 16, 2014.
55. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*. 2006;176(7):3877-3883.
56. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK Jr, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, Macri JV, Roberts WE. Genetic predisposition to external apical root resorption in orthodontic patients: Linkage of chromosome 18 marker. *J Dent Res*. 2003;82:356-360.
57. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK Jr, Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, Macri JV, Roberts WE. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;123:242-252.
58. Ngan DC, Kharbanda OP, Byloff FK, Darendeliler MA. The genetic contribution to orthodontic root resorption: a retrospective twin study. *Aust Orthod J*. 2004;20:1-9.
59. Gülden N, Eggermann T, Zerres K, Beer M, Meinelt A, Diedrich P. Interleukin-1 polymorphisms in relation to external apical root resorption (EARR). *J Orofac Orthop*. 2009;70:20-38.
60. Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Inoue I, Maki K. External apical root resorption and the interleukin-1B gene polymorphism in the Japanese population. *Orthod Waves*. 2009;68(4):152-157.
61. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJ, Gontijo AI, Miranda Cota LO, Brito RB Jr. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;136:542-546.
62. Iglesias-Linares A, Yañez-Vico R, Ballesta-Mudarra S, Ortiz-Ariza E, Ortega-Rivera H, Mendoza-Mendoza A, Solano-Reina E, Perea-Pérez E. Postorthodontic external root resorption is associated with IL1 receptor antagonist gene variations. *Oral Dis*. 2012;18:198-205.
63. Wu FL, Wang LY, Huang YQ, Guo WB, Liu CD, Li SG. Interleukin-1 β +3954 polymorphisms and risk of external apical root resorption in orthodontic treatment: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):4678-4686.
64. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:1-13.

65. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:282-290.
66. Grieve WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105:369-374.
67. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996;75:562-567.
68. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001;46:185-189.
69. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics.* 1992;13:654-657.
70. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi LM, Biunno I. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. *Immunogenetics.* 2002;54:82-86.
71. Pociot F, Mølviig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A *TaqI* polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion *in vitro*. *Eur J Clin Invest.* 1992;22:396-402.
72. Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S. Genetic control of IL-1beta bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist. *Eur J Immunol.* 2002;32:2988-2996.
73. Tolusso B, Pietrapertosa D, Morelli A, De Santis M, Gremese E, Farina G, Carniello SG, Del Frate M, Ferraccioli G. IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with protein plasma levels and response to therapy. *Pharmacogenomics.* 2006;7:683-695.
74. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol.* 1995;99:303-310.
75. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol.* 1998;28:2598-2602.

76. Rafiq S, Stevens K, Hurst AJ, Murray A, Henley W, Weedon MN, Bandinelli S, Corsi AM, Guralnik JM, Ferruci L, Melzer D, Frayling TM. Common genetic variation in the gene encoding interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) is associated with altered circulating IL-1RA levels. *Gene Immun.* 2007;8:344-351.
77. Linhartová P, Černochová P, Izakovičová Hollá L. IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia. *Oral Dis.* 2013;19(3):262-270.
78. Švábová M, Racek J, Marková M. Genetika ve stomatologii. *LKS.* 2012;22(12):256-262.
79. Izakovičová Hollá L, Bořilová Linhartová P, Hrdličková B, Marek F, Dolina J, Řihák V, Kala Z. Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barretts esophagus. *Hum Immunol.* 2013;74(9):1161-1169.
80. Sharpe W, Reed B, Subtelny JD, Polson A. Orthodontic relapse, apical root resorption, and crestal alveolar bone levels. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1987;91:252-258.
81. Apajalahti S, Peltola JS. Apical root resorption after orthodontic treatment - a retrospective study. *Eur J Orthod.* 2007;29:408-412.
82. Marques LS, Ramos-Jorge ML, Rey AC, Armond MC, Ruellas AC. Severe root resorption in orthodontic patients treated with the edgewise method: Prevalence and predictive factors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137:384-388.
83. Houston WJ. The analysis of error in orthodontic measurements. *Am J Orthod.* 1983;83:382-390.
84. Kjaer I. Morphological characteristics of dentitions developing excessive root resorption during orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 1995;17:25-34.
85. Beck BW, Harris EF. Apical root resorption in orthodontically treated subjects: analysis of edgewise and light wire mechanics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105:350-361.
86. Harris EF, Boggan BW, Wheeler DA. Apical root resorption in patients treated with comprehensive orthodontics. *J Tenn Dent Assoc.* 2001;81:30-33.
87. Bessler H, Osovsky M, Beilin B, Alcalay Y, Sirota L. The existence of tender difference in IL-1Ra gene polymorphism. *J Interferon Cytokine Res.* 2007;27:931-935.
88. You CG, Li JF, Xie XD, Zhu Y, Li PQ, Chen YR. Association of interleukin-1 genetic polymorphisms with the risk of rheumatoid arthritis in Chinese population. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45:968-971.

89. Achyut BR, Srivastava A, Bhattacharya S, Mittal B. Genetic association of interleukin-1beta (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86 bp repeat) polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in North Indians. *Clin Chim Acta*. 2007;377:163-169.
90. Stanghellini V. Three-month prevalence rates of gastrointestinal symptoms and the influence of demographic factors: results from the Domestic/International Gastroenterology Surveillance Study (Digest). *Scand J Gastroenterol*. 1999;231:20-28.
91. Enck P, Dubois D, Marquis P. Quality of life in patients with upper gastrointestinal symptoms: results from the Domestic/International Gastroenterology Surveillance Study (Digest). *Scand J Gastroenterol*. 1999;231:48-54.
92. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 1999;340:825-831.
93. Cameron AJ, Lagergren J, Henriksson C, Nyren O, Locke GR, Pedersen NL. Gastroesophageal reflux disease in monozygotic and dizygotic twins. *Gastroenterology* 2002;122:55-59.
94. Momammed I, Cherkas LF, Riley SA, Spector TD, Trudgill NJ. Genetic influences in gastro-oesophageal reflux disease: a twin study. *Gut*. 2003;52:1085-1089.
95. Terry P, Lagergren J, Wolk A, Neren O. Reflux-inducing dietary factors and risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Nutr Cancer*. 2000;38:186-191.
96. Holtmann G, Adam B, Liebrechts T. Review article: the patient with gastro-esophageal reflux disease--lifestyle advice and medication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20:24-27.
97. Chourasia D, Ghoshal UC. Pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease: what role do *Helicobacter pylori* and host genetic factors play? *Trop Gastroenterol*. 2008;29:13-19.
98. Ghoshal UC, Chourasia D. Genetic factors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Indian J Gastroenterol*. 2011;30:55-62.
99. Song JY, Kim HH, Cho EJ, Kim TY. The relationship between gastroesophageal reflux disease and chronic periodontitis. *Gut Liver*. 2014;8(1):35-40.
100. Filipi K, Halackova Z, Filipi V. Oral health status, salivary factors and microbial analysis in patients with active gastro-oesophageal reflux disease. *Int Dent J*. 2011;61(4):231-237.
101. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Førre O, Duff GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum*. 1995;38:221-228.

102. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997;24:72-77.
103. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet*. 1993;91:403-404.
104. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(4):3-10.
105. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):38-53.
106. Zoellner H. Dental infection and vascular disease. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(3):181-192.
107. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*. 2007;356(9):911-920.
108. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Koga T. The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study. *J Dent Res*. 2004;83(6):485-490.
109. Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:254-266.
110. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, Tsakos G. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3989-3994.
111. Deo V, Bhongade ML, Ansari S, Chavan RS. Periodontitis as a potential risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective study. *Indian J Dent Res*. 2009;20(4):466-470.
112. Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. *J Med Life*. 2013;6(3):244-248.
113. Sitholimela CS, Shangase LS. The association between periodontitis and pre-term birth and/or low birth weight: a literature review. *SADJ*. 2013;68(4):162-166.
114. Krejci CB, Bissada NF. Periodontitis--the risks for its development. *Gen Dent*. 2000;48(4):430-436; quiz 437-438.

115. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60(1):15-39.
116. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ; CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washington, Seattle, USA), Gary Slade (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), George W. Taylor (University of Michigan, Ann Arbor, USA), Wenche Borgnakke (University of Michigan, Ann Arbor, USA), and representatives of the American Academy of Periodontology. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012;91(10):914-920.
117. Armitage GC, Cullinan MP, Seymour GJ. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontol 2000*. 2010;53:7-11.
118. Könönen E, Müller HP. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2014;65(1):46-78.
119. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965;36:177-183.
120. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986;13(10):905-911.
121. Loesche WJ. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res*. 1979;58(12):2404-2412.
122. Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc Finn Dent Soc*. 1991;87:515-525.
123. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-271.
124. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*. 2014;35(1):3-11.
125. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(10):717-725.
126. Slots J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand J Dent Res*. 1977;85(2):114-121.

127. Listgarten MA, Helldén L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol.* 1978;5(2):115-132.
128. Smalley JW. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):320-328.
129. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol.* 2000;14:9-11.
130. Yucel-Lindberg T, Båge T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med.* 2013;15:e7. doi: 10.1017/erm.2013.8. Accessed April 16, 2014.
131. Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology 2000.* 2007;43:41-55.
132. Restaino CG, Chaparro A, Valenzuela MA, Kettlun AM, Vernal R, Silva A, Puente J, Jaque MP, León R, Gamonal J. Stimulatory response of neutrophils from periodontitis patients with periodontal pathogens. *Oral Dis.* 2007;13(5):474-481.
133. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 2002;23(6):301-304.
134. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005;32(6):57-71.
135. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest.* 1985;76(5):2003-2011.
136. Ozaki K, Hanazawa S, Takeshita A, Chen Y, Watanabe A, Nishida K, Miyata Y, Kitano S. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate synergistically the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in fibroblastic cells derived from human periodontal ligament. *Oral Microbiol Immunol.* 1996;11(2):109-114.
137. Ogawa T, McGhee ML, Moldoveanu Z, Hamada S, Mestecky J, McGhee JR, Kiyono H. *Bacteroides*-specific IgG and IgA subclass antibody-secreting cells isolated from chronically inflamed gingival tissues. *Clin Exp Immunol.* 1989;76(1):103-110.
138. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokines profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2004;35:21-41.

139. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:9-13.
140. Mossmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:128-146.
141. Zhang H, Wu LM, Wu J. Cross-talk between apolipoprotein E and cytokines. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:949072. doi: 10.1155/2011/949072. Accessed March 30, 2014.
142. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012;39(3):239-248.
143. Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. Osteoblast/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999;25(5):517-523.
144. Yoskovitz G, Garcia-Giralt N, Rodriguez-Sanz M, Urreiziti R, Guerri R, Ariño-Ballester S, Prieto-Alhambra D, Mellibovsky L, Grinberg D, Nogues X, Balcells S, Diez-Perez A. Analyses of RANK and RANKL in the post-GWAS context: functional evidence of vitamin D stimulation through a RANKL distal region. *J Bone Miner Res*. 2013;28(12):2550-2560.
145. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):482-496.
146. Park-Min KH, Ji JD, Antoniv T, Reid AC, Silver RB, Humphrey MB, Nakamura M, Ivashkiv LB. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol*. 2009;183(4):2444-2455.
147. Loos BG, John RP, Laine ML. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):159-179.
148. Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43:102-132.
149. Dumitrescu AL, Kobayashi J. *Genetic variants in periodontal health and disease*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.

150. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, Hsueh WC, Lange EM, Moss K, Barros SP, Weyant RJ, Liu Y, Newman AB, Beck JD, Offenbacher S. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet.* 2013;22(11):2312-2324.
151. Zhan Y, Zhang R, Lv H, Song X, Xu X, Chai L, Lv W, Shang Z, Jiang Y, Zhang R. Prioritization of candidate genes for periodontitis using multiple computational tools. *J Periodontol.* 2014. doi:10.1902/jop.2014.130523. Accessed March 30, 2014.
152. Laine ML, Loos BG, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Int J Dent.* 2010; Article ID 324719, 22 pages. doi: 10.1155/2010/324719. Accessed April 16, 2014.
153. Laine ML, Moustakis V, Koumakis L, Potamias G, Loos BG. Modeling susceptibility to periodontitis. *J Dent Res.* 2013;92(1):45-50.
154. Izakovičová Hollá L, Bučková D, Fassmann A, Halabala T, Vašků A, Vácha J. Promoter polymorphisms in the CD14 receptor gene and their potential association with the severity of chronic periodontitis. *J Med Genet.* 2002;39(11):844-848.
155. Izakovičová Hollá L, Bučková D, Fassmann A, Roubalíková L, Vaněk J. Lack of association between chronic periodontitis and the Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in a Czech population. *J Periodontal Res.* 2007;42(4):340-344.
156. Izakovičová Hollá L, Vokurka J, Hrdličková B, Augustín P, Fassmann A. Association of Toll-like receptor 9 haplotypes with chronic periodontitis in Czech population. *J Clin Periodontol.* 2010;37(2):152-159.
157. Izakovičová Hollá L, Kaňková K, Fassmann, Bučková D, Halabala T, Znojil V, Vaněk J. Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* 2002;72(12):1742-1746.
158. Fassmann A, Izakovičová Hollá L, Bučková D, Vašků A, Znojil V, Vaněk J. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontal Res.* 2003;38(4):394-399.
159. Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Vašků A, Znojil V, Vaněk J, Vácha J. Interactions of lymphotoxin alpha (TNF-beta), angiotensin-converting enzyme (ACE), and endothelin-1 (ET-1) gene polymorphisms in adult periodontitis. *J Periodontol.* 2001;72(1):85-89.

160. Izakovičová Hollá L, Bučková D, Fassmann A, beneš P, Znojil V. Plasminogen-activator-inhibitor-1 promoter polymorphism as a risk factor for adult periodontitis in non-smokers. *Genes Immun.* 2002;3(5):292-294.
161. Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Augustín P, Halabala T, Znojil V, Vaněk J. The association of interleukin-4 haplotypes with chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontol.* 2008;79(10):1927-1933.
162. Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Stejskalová A, Znojil V, Vaněk J, Vácha J. Analysis of the interleukin-6 gene promoter polymorphisms in Czech patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75(1):30-36.
163. Izakovičová Hollá L, Jurajda M, Fassmann A, Dvořáková N, Znojil V, Vácha J. 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.* 2004;31(8):685-960.
164. Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Vašků A, Goldbergová M, Beránek M, Znojil V, Vaněk J, Vácha J. Genetic variations in the human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2005;76(7):1056-1060.
165. Izakovičová Hollá L, Hrdličková B, Vokurka J, Fassmann A. Matrix metalloproteinase 8 (MMP8) gene polymorphisms in chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011;57(2):188-196.
166. Izakovičová Hollá L, Fassmann A, Mužík J, Vaněk J, Vašků A. Functional polymorphisms in the matrix metalloproteinase-9 gene in relation to severity of chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2006;77(11):1850-1855.
167. Izakovičová Hollá L, Hrdličková B, Linhartová P, Fassmann A. Interferon-gamma +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56(2):153-158.
168. Kim H, Gordon S, Dionne R. Genome-wide approaches (GWA) in oral and craniofacial diseases research. *Oral Dis.* 2013;19(2):111-120.
169. Finoti LS, Corbi SC, Anovazzi G, Teixeira SR, Steffens JP, Secolin R, Kim YJ, Orrico SR, Cirelli JA, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM. Association between IL8 haplotypes and pathogen levels in chronic periodontitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(10):1333-1340.

170. Bořilová Linhartová P, Vokurka J, Poskerová H, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2013; Article ID 342351, 8 pages. dx.doi.org/10.1155/2013/342351. Accessed April 16, 2014.
171. Poskerová H, Bořilová Linhartová P, Vokurka J, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Diabetes mellitus a orální zdraví. *Česká stomatologie.* 2014. Accepted for publication, 2014.
172. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Receptor binding of cholesterol-induced high-density lipoproteins containing predominantly apoprotein E to cultured fibroblasts with mutations at the low-density lipoprotein receptor locus. *Biochemistry.* 1980;19:4359-4365.
173. Schneider WJ, Kovanen PT, Brown MS, Goldstein JL, Utermann G, Weber W, Havel RJ, Kotite L, Kane JP, Innerarity TL, Mahley RW. Familial dysbetalipoproteinemia. Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows. *J Clin Invest.* 1981;68:1075-1085.
174. Kesäniemi YA, Ehnholm C, Miettinen TA. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J Clin Invest.* 1987;80(2):578-581.
175. Gylling H, Kontula K, Miettinen TA. Cholesterol absorption and metabolism and LDL kinetics in healthy men with different apoprotein E phenotypes and apoprotein B Xba I and LDL receptor Pvu II genotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:208-213.
176. Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL. Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(7):3433-3437.
177. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK. Apolipoprotein E polymorphism, age and coronary heart disease. *Ageing Res Rev.* 2007;6(2):94-108.
178. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):436-441.
179. Tsukamoto K, Tangirala RK, Chun S, Usher D, Puré E, Rader DJ. Hepatic expression of apolipoprotein E inhibits progression of atherosclerosis without reducing cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *Mol Ther.* 2000;1(2):189-194.

180. Sacre SM, Stannard AK, Owen JS. Apolipoprotein E (ApoE) isoforms differentially induce nitric oxide production in endothelial cells. *FEBS Lett.* 2003;540(1-3):181-187.
181. Ali K, Middleton M, Puré E, Rader DJ. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response *in vivo*. *Circ Res.* 2005;97(9):922-927.
182. Kattan OM, Kasravi FB, Elford EL, Schell MT, Harris HW. Apolipoprotein E-mediated immune regulation in sepsis. *J Immunol.* 2008;181(2):1399-1408.
183. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harperova biochemie*. 3rd ed. Jinočany, Czechia: H+H Vyšehradská, s.r.o.; 2002.
184. Werb Z, Chin JR, Takemura R, Oropeza RL, Bainton DF, Stenberg P, Taylor JM, Reardon C. The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages. *Ciba Found Symp.* 1986;118:155-171.
185. Larkin L, Khachigian LM, Jessup W. Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). *Int J Mol Med.* 2000;6(3):253-258.
186. Baitsch D, Bock HH, Engel T, Telgmann R, Müller-Tidow C, Varga G, Bot M, Herz J, Robenek H, von Eckardstein A, Nofer JR. Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1160-1168.
187. Dobson CB, Sales SD, Hoggard P, Wozniak MA, Crutcher KA. The receptor-binding region of human apolipoprotein E has direct anti-infective activity. *J Infect Dis.* 2006;193(3):442-450.
188. Wang C, Wang Y, Wang A, Fu P, Yang Y. The diagnostic value of apolipoprotein E in pediatric patients with invasive bacterial infections. *Clin Biochem.* 2012;45(3):215-218.
189. Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation.* 2002;105(7):861-867.
190. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(8):1405-1411.
191. Ford PJ, Gemmell E, Timms P, Chan A, Preston FM, Seymour GJ. Anti-*P. gingivalis* response correlates with atherosclerosis. *J Dent Res.* 2007;86(1):35-40.
192. Hayashi C, Viereck J, Hua N, Phinikaridou A, Madrigal AG, Gibson FC 3rd, Hamilton JA, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory

- atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;215(1):52-59.
193. Lee HR, Jun HK, Choi BK. *Tannerella forsythia* BspA increases the risk factors for atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Oral Dis*. 2013. doi: 10.1111/odi.12214. Accessed March 30, 2014.
194. Breslow JL, McPherson J, Nussbaum AL, Williams HW, Lofquist-Kahl F, Karathanasis SK, Zannis VI. Identification and DNA sequence of a human apolipoprotein E cDNA clone. *J Biol Chem*. 1982;257(24):14639-14641.
195. Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*. 1981;256(17):9077-9083.
196. Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem*. 1982;257(8):4171-4178.
197. Saito H, Dhanasekaran P, Baldwin F, Weisgraber KH, Phillips MC, Lund-Katz S. Effects of polymorphism on the lipid interaction of human apolipoprotein E. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40723-40729.
198. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298(11):1300-1311.
199. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE, Cavrois M, Huang Y, Mahley RW, Dolan MJ, McCune JM, Ahuja SK. Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(25):8718-8723.
200. Sadigh-Eteghad S, Talebi M, Farhoudi M. Association of apolipoprotein E epsilon 4 allele with sporadic late onset Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012;17(4):321-326.
201. Mustapic M, Popovic Hadzija M, Pavlovic M, Pavkovic P, Presecki P, Mrazovac D, Mimica N, Korolija M, Pivac N, Muck-Seler D. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: the association study of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha and apolipoprotein E genes. *Metab Brain Dis*. 2012;27(4):507-512.
202. Price DA, Bassendine MF, Norris SM, Golding C, Toms GL, Schmid ML, Morris CM, Burt AD, Donaldson PT. Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut*. 2006;55(5):715-718.

203. Hopkins PN, Wu LL, Schumacher MC, Emi M, Hegele RM, Hunt SC, Lalouel JM, Williams RR. Type III dyslipoproteinemia in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia and apolipoprotein E2. Evidence for a gene-gene interaction. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(5):1137-1146.
204. Huang X, Chen PC, Poole C. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2004;62(12):2198-2202.
205. Yin YW, Qiao L, Sun QQ, Hu AM, Liu HL, Wang Q, Hou ZZ. Influence of apolipoprotein E gene polymorphism on development of type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population: A meta-analysis of 29 studies. *Metabolism.* 2013. doi: 10.1016/j.metabol.2013.12.008. Accessed March 18, 2014.
206. Lösche W, Karapetow F, Pohl A, Pohl C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2000;27(8):537-541.
207. Moeintaghavi A, Haerian-Ardakani A, Talebi-Ardakani M, Tabatabaie I. Hyperlipidemia in patients with periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 2005;6(3):78-85.
208. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol.* 2005;76(11):2085-2088.
209. Taleghani F, Shamaei M, Shamaei M. Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Acta Med Iran.* 2010;48(1):47-50.
210. Sharma S, Lamsal M, Sharma SK, Niraula SR, Koirala B. Association of serum LDL cholesterol level with periodontitis among patients visiting a tertiary-care hospital. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2011;51(183):104-108.
211. Pejčić A, Kesić L, Ilić S, Pesić Z, Mirković D. Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Vojnosanit Pregl.* 2012;69(9):771-777.
212. Lee JB, Yi HY, Bae KH. The association between periodontitis and dyslipidemia based on the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol.* 2013;40(5):437-442.
213. Penumarthy S, Penmetsa GS, Mannem S. Assessment of serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol in periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(1):30-35.
214. Máchal J, Vašků A, Hlinomaz O, Linhartová P, Groch L, Vítovec J. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD. *Biomed Pap.* 2012;156(2):151-158.

215. Ferreira CN, Carvalho MG, Fernandes AP, Lima LM, Loures-Valle AA, Dantas J, Janka Z, Palotás A, Sousa MO. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochem Int.* 2010;56(1):177-182.
216. Smalinskiene A, Petkeviciene J, Luksiene D, Jureniene K, Klumbiene J, Lesauskaite V. Association between APOE, SCARB1, PPAR α polymorphisms and serum lipids in a population of Lithuanian adults. *Lipids Health Dis.* 2013;12:120. doi: 10.1186/1476-511X-12-120. Accessed April 16, 2014.
217. Mazzotti DR, Singulane CC, Ota VK, Rodrigues TP, Furuya TK, de Souza FJ, Cordeiro BG, de Oliveira Amaral CM, Chen ES, Jacomini A, de Arruda Cardoso Smith M, Borsatto-Galera B. Association of APOE, GCPII and MMP9 polymorphisms with common diseases and lipid levels in an older adult/elderly cohort. *Gene.* 2014;535(2):370-375.
218. Boulenouar H, Mediene Benchekor S, Meroufel DN, Lardjam Hetraf SA, Ouhaibi Djellouli H, Hermant X, Grenier-Boley B, Hamani Medjaoui I, Saidi Mehtar N, Amouyel P, Houti L, Meirhaeghe A, Goumidi L. Impact of APOE gene polymorphisms on the lipid profile in an Algerian population. *Lipids Health Dis.* 2013;12:155. doi: 10.1186/1476-511X-12-155. Accessed April 16, 2014.
219. Calero O, Hortigüela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by Real Time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan[®] and FRET assays. *J Neurosci Methods.* 2009;183(2):238-240.
220. Corbo RM, Scacchi R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet.* 1999;63(4):301-310.
221. Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med.* 1982;155(3):914-923.
222. Rabin EM, Ohara J, Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(9):2935-2939.
223. Panayiotidis P, Ganeshaguru K, Jabbar SA, Hoffbrand AV. Interleukin-4 inhibits apoptotic cell death and loss of the bcl-2 protein in B-chronic lymphocytic leukaemia cells *in vitro.* *Br J Haematol.* 1993;85(3):439-445.

224. Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3803-3807.
225. Mangan DF, Robertson B, Wahl SM. IL-4 enhances programmed cell death (apoptosis) in stimulated human monocytes. *J Immunol*. 1992;148(6):1812-1816.
226. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. *Eur J Immunol*. 1990;20(11):2375-2381.
227. Shapira L, van Dyke TE, Hart TC. A localized absence of interleukin-4 triggers periodontal disease activity: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 1992;39(4):319-322.
228. Yamamoto M, Kawabata K, Fujihashi K, McGhee JR, Van Dyke TE, Bamberg TV, Hiroi T, Kiyono H. Absence of exogenous interleukin-4-induced apoptosis of gingival macrophages may contribute to chronic inflammation in periodontal diseases. *Am J Pathol*. 1996;148(1):331-339.
229. Yamazaki K, Nakajima T, Gemmell E, Polak B, Seymour GJ, Hara K. IL-4- and IL-6-producing cells in human periodontal disease tissue. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(8):347-353.
230. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2003;30(11):996-1002.
231. Tsai CC, Ku CH, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Changes in gingival crevicular fluid interleukin-4 and interferon-gamma in patients with chronic periodontitis before and after periodontal initial therapy. *Kaohsiung J Med Sci*. 2007;23(1):1-7.
232. McFarlane CG, Meikle MC. Interleukin-2, interleukin-2 receptor and interleukin-4 levels are elevated in the sera of patients with periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1991;26(5):402-408.
233. Sutherland GR, Baker E, Callen DF, Hyland VJ, Wong G, Clark S, Jones SS, Eglinton LK, Shannon MF, Lopez AF, Vadas MA. Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. *Hum Genet*. 1988;79(4):335-337.

234. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. 1994;264(5162):1152-1156.
235. Michel J, Gonzáles JR, Wunderlich D, Diète A, Herrmann JM, Meyle J. Interleukin-4 polymorphisms in early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):483-488.
236. Kang BY, Choi YK, Choi WH, Kim KT, Choi SS, Kim K, Ha NJ. Two polymorphisms of interleukin-4 gene in Korean adult periodontitis. *Arch Pharm Res*. 2003;26(6):482-486.
237. Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB Jr, Line SR. Investigation of IL4 gene polymorphism in individuals with different levels of chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2003;30(4):341-345.
238. Pontes CC, Gonzales JR, Novaes AB Jr, Taba Júnior M, Grisi MF, Michel J, Meyle J, de Souza SL. Interleukin-4 gene polymorphism and its relation to periodontal disease in a Brazilian population of African heritage. *J Dent*. 2004;32(3):241-246.
239. Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J. Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004;31(5):384-389.
240. Kara N, Keles GC, Sumer P, Gunes SO, Bagci H, Koprulu H, Bek Y. Association of the polymorphisms in promoter and intron regions of the interleukin-4 gene with chronic periodontitis in a Turkish population. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(5):292-297.
241. Hooshmand B, Hajilooi M, Rafiei A, Mani-Kashani KH, Ghasemi R. Interleukin-4 (C-590T) and interferon-gamma (G5644A) gene polymorphisms in patients with periodontitis. *J Periodontol Res*. 2008;43(1):111-115.
242. Anovazzi G, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Polymorphisms and haplotypes in the interleukin-4 gene are associated with chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol*. 2010;81(3):392-402.
243. Donati M, Berglundh T, Hytönen AM, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Padyukov L. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*. 2005;32(5):474-479.

244. Reichert S, Stein JM, Klapproth J, Zimmermann U, Reichert Y, Gläser C, Schaller HG, Schulz S. The genetic impact of the Q551R interleukin-4 receptor alpha polymorphism for aggressive or chronic periodontitis and the occurrence of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56(12):1485-1493.
245. Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest.* 2004;126:1832-1839.
246. Mout R, Willemze R, Landegent JE. Repeat polymorphism in the interleukin-4 gene (IL-4). *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3763.
247. Bártová J, Krátká-Opatrná Z, Procházková 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;9:115-120.
248. Krátká Z, Bártová J, Krejsa O, Otčenášková M, Janatová T, Dušková J. Interleukin-1 gene polymorphisms as assessed in a 10-year study of patients with early onset periodontitis. *Folia microbial.* 2007;52:183-188.
249. Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol.* 2014;59(2):167-175.
250. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, Moura-Costa LF, Cerqueira EM, Galdino-Neto M, Alves H, Carvalho-Filho PC, Xavier MT, Meyer R. Induction of interleukin (IL)-1 β , IL-10, IL-8 and immunoglobulin G by *Porphyromonas gingivalis* HmuY in humans. *J Periodontal Res.* 2012;47(1):27-32.
251. Trindade SC, Olczak T, Gomes-Filho IS, de Moura-Costa LF, Vale VC, Galdino-Neto M, Alves Dos Santos H, de Carvalho Filho PC, Stocker A, Bendicho MT, Xavier MT, de Moraes Marcílio Cerqueira E, Meyer R. *Porphyromonas gingivalis* HmuY-induced production of interleukin-6 and IL-6 polymorphism in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2013;84(5):650-665.
252. Gonzales JR, Groeger S, Johansson A, Meyle J. T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *Clin Oral Investig.* 2013. doi: 10.1007/s00784-013-1162-5. Accessed March 24, 2014.

253. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1989;1(1):2-13.
254. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*. 1989;243(4897):1464-1466.
255. Godaly G, Hang L, Freund us B, Svanborg C. Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *J Immunol*. 2000;165(90):5287-5294.
256. Huang GT, Haake SK, Park NH. Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J Periodontol*. 1998;69(10):1105-1110.
257. Sfakianakis A, Barr CE, Kreutzer D. Mechanisms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced expression of interleukin-8 in gingival epithelial cells. *J Periodontol*. 2001;7(10):1413-1419.
258. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, Yamada S, Takedachi M, Nozaki T, Ozawa Y, Nakahira Y, Saho T, Ogo H, Shimabukuro Y, Okada H, Murakami S. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol*. 2004;75(3):370-379.
259. Onishi S, Honma K, Liang S, Stathopoulou P, Kinane D, Hajishengallis G, Sharma A. Toll-like receptor 2-mediated interleukin-8 expression in gingival epithelial cells by *Tannarella forsythia* leucine-rich repeat protein BspA. *Infect Immun*. 2008;76(1):198-205.
260. Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun*. 1992;60(11):4932-4937.
261. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1995;66(10):852-859.
262. Dongari-Bagtzoglou AI, Ebersole JL. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J Periodontol*. 1998;69(8):899-910.
263. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol*. 2003;30(2):145-153.

264. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-6 and interleukin-8 levels in chronic periodontitis. *Int J Dent*. 2012; Article ID 362905, 8 pages. doi: 10.1155/2012/362905. Accessed April 16, 2014.
265. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol*. 1989;143(4):1366-1371.
266. Fey MF, Tobler A. An interleukin-8 (IL-8) cDNA clone identifies a frequent *HindIII* Polymorphism. *Hum Genet*. 1996;9(3):298.
267. Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, Welsh K, Bunn C, Knight C, Foley P, du Bois RM. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arth Rheum*. 2000;43(7):1633-1640.
268. Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax*. 2000;55(12):1023-1027.
269. Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int*. 2002;62(1):261-265.
270. Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Lack of association of a functional polymorphism in the interleukin 8 gene with susceptibility to periodontitis. *DNA Cell Biol*. 2009;28(4):185-190.
271. Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Orrico SR, Cirelli JA, Mendes-Junior CT, Scarel-Caminaga RM. Association of haplotypes in the IL8 gene with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population. *Clin Chim Acta*. 2010;411(17-18):1264-1268.
272. Scarel-Caminaga RM, Kim YJ, Viana AC, Curtis KM, Corbi SC, Soqumo PM, Orrico SR, Cirelli JA. Haplotypes in the interleukin 8 gene and their association with chronic periodontitis susceptibility. *Biochem Genet*. 2011;49(5-6):292-302.
273. Andia DC, de Oliviera NF, Letra AM, Nociti FH Jr, Line SR, de Souza AP. Interleukin-8 gene promoter polymorphism (rs4073) may contribute to chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011;82(6):893-899.
274. Corbi SCT, Anovazzi G, Finoti LS, Kim YJ, Capela MV, Secolin R, Marcaccini AM, Gerlach RF, Orrico SRP, Cirelli JA, Scarel-Caminaga RM. Haplotypes of susceptibility to chronic periodontitis in the Interleukin 8 gene do not influence protein level in the gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol*. 2012;57(10):1355-1361.

275. Andia DC, Letra A, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, de Souza AP. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2013;58(2):211-217.
276. Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gómez M, Torres O, Flórez L, González CI, Flórez O. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endodont J.* 2013;46(1):71-78.
277. Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, Liang H, Liao P, Loo WT, Cheung MN, Chow LW. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine.* 2012;60(2):552-560.
278. Houshmand B, Hajilooi M, Rafiei A, Bidgoli M, Soheilifar S. Evaluation of IL-8 gene polymorphisms in patients with periodontitis in Hamedan, Iran. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(4):427-432.
279. Life Technologies Corporation. Product Bulletin: TaqMan[®] SNP Genotyping Assays. 2011. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf. Accessed April 16, 2014.
280. Cooke GS, Hill AV. Genetics of susceptibility to human infectious disease. *Nat Rev Genet.* 2001;2(12):967-977.
281. Nibali L, Tonetti MS, Ready D, Parkar M, Brett PM, Donos N, D'Aiuto F. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *J Periodontol.* 2008;79(4):677-683.
282. Nibali L, Madden I, Franch Chillida F, Heitz-Mayfield L, Brett P, Donos N. IL6 -174 genotype associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Indians. *Oral Dis.* 2011;17(2):232-237.
283. Nibali L, D'Aiuto F, Ready D, Parkar M, Yahaya R, Donos N. No association between *A actinomycetemcomitans* or *P gingivalis* and chronic or aggressive periodontitis diagnosis. *Quintessence Int.* 2012;43(3):247-254.
284. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995;378(6552):88-91.

285. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:423-474.
286. Biet F, Loch C, Kremer L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med*. 2002;80:147-162.
287. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H. Caspase-1 processes IFN-gamma inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*. 1997;386:619-623.
288. Takeuchi M, Okura T, Mori T, Akita K, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. Intracellular production of interleukin-18 in human epithelial-like cell lines is enhanced by hyperosmotic stress in vitro. *Cell Tissue Res*. 1999;297:467-473.
289. Barker BR, Taxman DJ, Ting JP. Cross-regulation between the IL-1 β /IL-18 processing inflammasome and other inflammatory cytokines. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):591-597.
290. Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann H. Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol*. 1997;159:6156-6163.
291. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P, Klinge B, Gustafsson A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36(7):541-549.
292. Sánchez-Hernández PE, Zamora-Perez AL, Fuentes-Lerma M, Robles-Gómez C, Mariaud-Schmidt RP, Guerrero-Velázquez C. IL-12 and IL-18 levels in serum and gingival tissue in aggressive and chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2011;17(5):522-529.
293. Yee M, Kim A, Alpagot T, Düzgüneş N, Konopka K. *Porphyromonas gingivalis* stimulates IL-18 secretion in human monocytic THP-1 cells. *Microbes Infect*. 2012;14(9):684-649.
294. Yoshinaka K, Shoji N, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sugawara S, Sasano T. Increased interleukin-18 in the gingival tissues evokes chronic periodontitis after bacterial infection. *Tohoku J Exp Med*. 2014;232(3):215-222.
295. Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2–q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics*. 1998;51(1):161-163.

296. Kalina U, Ballas K, Koyama N, Kauschat D, Miething C, Arnemann J, Martin H, Hoelzer D, Ottmann OG. Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene. *Scand J Immunol.* 2000;52:525-530.
297. Noack B, Görgens H, Lorenz K, Ziegler A, Hoffmann T, Schackert HK. TLR4 and IL-18 gene variants in aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2008;35(12):1020-1026.
298. Noack B, Görgens H, Lorenz K, Schackert HK, Hoffmann T. TLR4 and IL-18 gene variants in chronic periodontitis: Impact on disease susceptibility and severity. *Immunol Invest.* 2009;38:297-310.
299. Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol.* 2001;112:146-152.
300. Arimitsu J, Hirano T, Higa S, Kawai M, Naka T, Ogata A, Shima Y, Fujimoto M, Yamadori T, Hagiwara K, Ohgawara T, Kuwabara Y, Kawase I, Tanaka T. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;342(4):1413-1416.
301. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, Foster PS, Mattes J. Polymorphisms in the IL18 gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1):117-122.
302. Folwaczny M, Glas J, Török HP, Tonenchi L, Paschos E, Bauer B, Limbersky O, Folwaczny C. Polymorphisms of the interleukin-18 gene in periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2005;32:530-534.
303. Vokurka J, Klapusová L, Pantuckova P, Kukletova M, Kukla L, Holla LI. The association of MMP-9 and IL-18 gene promoter polymorphisms with gingivitis in adolescents. *Arch Oral Biol.* 2009;54:172-178.
304. Martelli FS, Mengoni A, Martelli M, Rosati C, Fanti E. IL-18 gene promoter polymorphisms are only moderately associated with periodontal disease in Italian population. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2012;9(3):153-156.
305. Li ZG, Li JJ, Sun CA, Jin Y, Wu WW. Interleukin-18 promoter polymorphisms and plasma levels are associated with increased risk of periodontitis: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2014;63(1):45-52.

306. Nagasawa T, Noda M, Katagiri S, Takaichi M, Takahashi Y, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Ohara S, Kawaguchi Y, Tagami T, Furuichi Y, Izumi Y. Relationship between periodontitis and diabetes – importance of a clinical study to prove the vicious cycle. *Intern Med.* 2010;49(10):881-885.
307. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal disease. *J Periodontol.* 2006;77:1289-1303.
308. Mealey BL. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. *J Am Dent Assoc.* 2006;137 Suppl:26-31.
309. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health.* 2008;122(4):417-433.
310. Dumitrescu AL, Inagaki K. Interrelationships between periodontal disease and mortality, cardiovascular disease, metabolic syndrome, diabetes mellitus. In: Dumitrescu AL. *Etiology and pathogenesis of periodontal disease.* Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010:145-150.
311. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. Study of cytokine production in inflamed human gingival tissues in periodontitis. Interleukin-1 (IL-1 alpha, beta) and tumor necrosis factor (TNF alpha). *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi.* 1989;31(3):843-848.
312. Jiang ZL, Cui YQ, Gao R, Li Y, Fu ZC, Zhang B, Guan CC. Study of TNF- α , IL-1 β and LPS levels in the gingival crevicular fluid of a rat model of diabetes mellitus and periodontitis. *Dis Markers.* 2013;34(5):295-304.
313. Odegaard JI, Chawla A. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(3):a007724. doi: 10.1101/cshperspect.a007724. Accessed April 16, 2014.
314. Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE₂, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):40-50.
315. Bulut U, Develioglu H, Taner IL, Berker E. Interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid in type 2 diabetes mellitus and adult periodontitis. *J Oral Sci.* 2001;43(3):171-177.

316. Atieh MA, M Faggion C Jr, Seymour GJ. Cytokines in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014. doi: 10.1016/j.diabres.2014.02.002. Accessed March 24, 2014.
317. Aspriello SD, Zizzi A, Tirabassi G, Buldreghini E, Biscotti T, Faloia E, Stramazzotti D, Boscaro M, Piemontese M. Diabetes mellitus-associated periodontitis: differences between type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res.* 2011;46(2):164-169.
318. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2004;75(9):1203-1208.
319. Chan HH, Rahim ZH, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary proteins associated with periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4642-4654.
320. Ruotsalainen E, Salmenniemi U, Vauhkonen I, Pihlajamäki J, Punnonen K, Kainulainen S, Laakso M. Changes in inflammatory cytokines are related to impaired glucose tolerance in offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(12):2714-2720.
321. Hao L, Li JL, Yue Y, Tian Y, Wang M, Loo WT, Cheung MN, Chow LW, Liu Q, Yip AY, Ng EL. Application of interleukin-1 genes and proteins to monitor the status of chronic periodontitis. *Int J Biol Markers.* 2013;28(1):92-99.
322. Tawil G, Akl FA, Dagher MF, Karam W, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, Jurjus AR. Prevalence of IL-1 β +3954 and IL-1 α -889 polymorphisms in the Lebanese population and its association with the severity of adult chronic periodontitis. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012;26(4):597-606.
323. Mao M, Zeng XT, Ma T, He W, Zhang C, Zhou J. Interleukin-1 α -899 (+4845) C \rightarrow T polymorphism increases the risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis of 23 case-control studies. *Gene.* 2013;532(1):114-119.
324. Deng JS, Qin P, Li XX, Du YH. Association between interleukin-1 β C (3953/4)T polymorphism and chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis. *Hum Immunol.* 2013;74(3):371-378.
325. Gayathri R, Saadi AV, Bhat KM, Bhat SG, Satyamoorthy K. Allele, genotype, and composite genotype effects of IL-1A +4845 and IL-1B +3954 polymorphisms for chronic periodontitis in an Indian population. *Indian J Dent Res.* 2011;22(4):612. doi: 10.4103/0970-9290.90323. Accessed April 16, 2014.

326. Karasneh JA, Ababneh KT, Taha AH, Al-Abbadi MS, Ollier WE. Investigation of the interleukin-1 gene cluster polymorphisms in Jordanian patients with chronic and aggressive periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(3):269-276.
327. Maria de Freitas N, Imbronito AV, Neves AC, Nunes FD, Pustiglioni FE, Lotufo RF. Analysis of IL-1A(-889) and TNFA(-308) gene polymorphism in Brazilian patients with generalized aggressive periodontitis. *Eur Cytokine Netw.* 2007;18(3):142-147.
328. Shete AR, Joseph R, Vijayan NN, Srinivas L, Banerjee M. Association of single nucleotide gene polymorphism at interleukin-1beta +3954, -511, and -31 in chronic periodontitis and aggressive periodontitis in Dravidian ethnicity. *J Periodontol.* 2010;81(1):62-69.
329. Yücel OO, Berker E, Mescil L, Eratalay K, Tepe E, Tezcan I. Association of interleukin-1 beta (+3954) gene polymorphism and gingival crevicular fluid levels in patients with aggressive and chronic periodontitis. *Genet Couns.* 2013;24(1):21-35.
330. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T. Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol.* 2002;73(1):27-32.
331. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2007;34(4):305-317.
332. Nikolopoulos GK, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol.* 2008;35(9):754-767.
333. Berdeli A, Emingil G, Gürkan A, Atilla G, Köse T. Association of the IL-1RN2 allele with periodontal diseases. *Clin Biochem.* 2006;39(4):357-362.
334. Ding C, Zhao L, Sun Y, Li L, Xu Y. Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism (rs2234663) and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):585-593.
335. Bid HK, Konwar R, Agrawal CG, Banerjee M. Association of IL-4 and IL-1RN (receptor antagonist) gene variants and the risk of type 2 diabetes mellitus: a study in the north Indian population. *Indian J Med Sci.* 2008;62(7):259-266.
336. Krikovsky D, Vásárhelyi B, Treszl A, Körner A, Tordai A, Tulassay T, Madácsy L. Genetic polymorphism of interleukin-1beta is associated with risk of type 1 diabetes mellitus in children. *Eur J Pediatr.* 2002;161(9):507-508.

337. Luotola K, Pietilä A, Zeller T, Moilanen L, Kähönen M, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Blankenberg S, Jula A, Perola M, Salomaa V; Health 2000 and FINRISK97 Studies. Association between interleukin-1 (IL-1) gene variations of IL-1 receptor antagonist and the development type 2 diabetes. *J Intern Med.* 2011;269(3):322-332.
338. Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol.* 2003;74(8):1183-1190.
339. Struch F, Dau M, Schwahn C, Biffar R, Kocher T, Meisel P. Interleukin-1 gene polymorphism, diabetes, and periodontitis: results from the Study of Health in Pomerania (SHIP). *J Periodontol.* 2008;79(3):501-507.
340. López NJ, Venezuela CY, Jara L. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms associated with periodontal disease in type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2009;80(10):1590-1598.
341. Brett PM, Zygogianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D'Aiuto F, Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res.* 2005;84(12):1149-1153.
342. Sakellari D, Koukoudetsos S, Arsenakis M, Konstantinidis A. Prevalence of IL-1A and IL-1B polymorphisms in a Greek population. *J Clin Periodontol.* 2003;30(1):35-41.
343. Bascones-Martínez A, Valderrama G, Vijande F, Puyet-Catalina A, Bascones-Ilundain J, Arias-Herrera S, Garrido-Pertierra A. Interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal status in a Spanish population. *Mol Med Rep.* 2012;5(5):1335-1339.
344. Wagner J, Kaminski WE, Aslanidis C, Moder D, Hiller KA, Christgau M, Schmitz G, Schmalz G. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007;34(10):823-827.
345. Luotola K, Pääkkönen R, Alanne M, Lanki T, Moilanen L, Surakka I, Pietilä A, Kähönen M, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Peters A, Jula A, Perola M, Salomaa V; Health 2000 AIRGENE Study Groups. Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4575-4583.
346. Settin A, Ismail A, El-Magd MA, El-Baz R, Kazamel A. Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity.* 2009;42(1):50-55.

347. Kulkarni GV, Chng T, Eny KM, Nielsen D, Wessman C, El-Sohehy A. Association of GLUT2 and TAS1R2 genotypes with risk for dental caries. *Caries Res.* 2013;47(3):219-225.
348. Descroix V, Kato S, Lézot F, Berdal A. Physiopathology of dental rickets in vitamin D receptor-ablated mice. *J Dent Res.* 2010;89(12):1427-1432.
349. Fontana ML, de Souza CM, Bernardino JF, Hoette F, Hoette ML, Thum L, Ozawa TO, Capelozza Filho L, Olandoski M, Trevilatto PC. Association analysis of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with external apical root resorption in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;142(3):339-347.
350. Baldini A, Nota A, Fanti E, Martelli FS, Ottomano C, Lippi G. Association between periodontal disease and Interleukin-1 β +3953 and vitamin D receptor *TaqI* genetic polymorphisms in an Italian caucasian population. *Ann Stomatol (Roma).* 2013;4(2):191-195.
351. Park OJ, Shin SY, Choi Y, Kim MH, Chung CP, Ku Y, Kim KK. The association of osteoprotegerin gene polymorphisms with periodontitis. *Oral Dis.* 2008;14(5):440-444.
352. Antonoglou G, Knuutila M, Niemelä O, Hiltunen L, Raunio T, Karttunen R, Vainio O, Ylöstalo P, Tervonen T. Serum 1,25(OH)D level increases after elimination of periodontal inflammation in T1DM subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):3999-4005.

8. Seznam zkratek

(m)RNA	(mediátorová) ribonukleová kyselina, (<i>messenger</i>) <i>ribonucleic acid</i>
A	adenin, <i>adenine</i>
AGEs	pokročilé produkty glykace, <i>advanced glycation end products</i>
AgP	agresivní parodontitida, <i>aggressive periodontitis</i>
ApoE	apolipoprotein E, <i>apolipoprotein E</i>
Arg nebo R	arginin, <i>arginine</i>
C	cytosin, <i>cytosine</i>
CD14	diferenciační skupina 14, <i>cluster of differentiation 14</i>
CI	interval spolehlivosti, <i>confidence interval</i>
CP	chronická parodontitida, <i>chronic periodontitis</i>
CXCR	CXC chemokinový receptor, <i>CXC chemokine receptor</i>
Cys nebo C	cystein, <i>cysteine</i>
DM	diabetes mellitus, <i>diabetes mellitus</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EARR	zevní apikální kořenová resorpce, <i>external apical root resorption</i>
ELSPAC	Evropská longitudinální studie těhotenství a dětství, <i>European Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood</i>
FNUSA	Fakultní nemocnice u svaté Anny, <i>St. Anne's University Hospital</i>
G	guanin, <i>guanine</i>
G-	Gram negativní, <i>Gram negative</i>
G+	Gram pozitivní, <i>Gram positive</i>
GCF	sulkulární tekutina, <i>gingival crevicular fluid</i>
GEC	gingivální epiteliální buňky, <i>gingival epithelial cells</i>
GERD	gastroezofageální refluxní choroba, <i>gastroesophageal reflux disease</i>
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě, <i>high-density lipoprotein</i>
HLA	hlavní histokompatibilní systém, <i>human leukocyte antigen</i>
HSP70	heat shock protein 70, <i>heat shock protein 70</i>
IFN- γ	interferon- γ , <i>interferon-γ</i>
Ig	imunoglobulin, <i>immunoglobulin</i>
IL	interleukin, <i>interleukin</i>
IL-1RA	antagonista IL-1 receptoru, <i>IL-1 receptor antagonist</i>
IL-1RN	gen pro IL-1RA, <i>IL-1RA gene</i>
IL-1RN*S nebo *L	krátká alela nebo dlouhá alela IL-1RN, <i>short or long allele of IL-1RN</i>
KPE	index kazivosti chrupu, <i>decayed, missing, filled index (DMF)</i>
LDL	lipoprotein o nízké hustotě, <i>low-density lipoprotein</i>

LF MU	Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, <i>Faculty of Medicine, Masaryk University</i>
LPS	lipopolysacharid, <i>lipopolysaccharide</i>
LTF	laktoferin, <i>lactotransferrin</i>
Lys nebo K	lysin, <i>lysine</i>
MMP	matrixová metaloproteináza, <i>matrix metalloproteinase</i>
N	počet, <i>number</i>
OPG	osteoprotegerin, <i>osteoprotegerin</i>
OR	poměr šancí, <i>odds ratio</i>
P	hladina významnosti, <i>level of significance</i>
P2X7R	purinergní receptor P2X7, <i>purinergic receptor P2X7</i>
PAMPs	molekulové vzory asociované s patogenem, <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce, <i>polymerase chain reaction</i>
PGE	prostaglandin E, <i>prostaglandin E</i>
PMN	polymorfonukleární leukocyt, <i>polymorphonuclear leukocyte</i>
PRRs	receptory rozpoznávající patogeny, <i>pathogen recognition receptors</i>
RA	restrikční analýza, <i>restriction analysis</i>
RANK(L)	(ligand) aktivátor(u) receptoru nukleárního faktoru κ B, <i>receptor activator of nuclear κB (ligand)</i>
SD	směrodatná odchylka, <i>standard deviation</i>
SNP	jednonukleotidový polymorfismus, <i>single nucleotide polymorphism</i>
T	thymin, <i>thymine</i>
T1DM	diabetes mellitus 1. Typu, <i>Type 1 diabetes mellitus</i>
T2DM	diabetes mellitus 2. Typu, <i>Type 2 diabetes mellitus</i>
TG	triglycerid, <i>triglyceride</i>
TH	pomocný T-lymfocyt, <i>T helper cell</i>
TLR	toll-like receptor, <i>toll-like receptor</i>
TNF- α	tumor nekrotizující faktor- α , <i>tumor necrosis factor-α</i>
TREG	regulační T-lymfocyt, <i>regulatory T-cell</i>
UV	ultrafialové, <i>ultraviolet</i>
VDR	receptor vitamínu D, <i>vitamin D receptor</i>
VLDL	lipoprotein o velmi nízké hustotě, <i>very low-density lipoprotein</i>
VNTR	variabilní počet tandemových repetitiv, <i>variable number of tandem repeats</i>

9. Seznam obrázků

Obr. 1 - Parodontitida způsobená polymikrobiální synergií a dysbiózou u citlivých hostitelů.....	49
Obr. 2 - Subgingivální mikrobiální komplexy, rozdělení bakterií do 5 barevných komplexů.....	50
Obr. 3 - Schéma patogeneze parodontitidy.....	51
Obr. 4 - Zánětlivé mediátory v patogenezi parodontitidy.....	54
Obr. 5 - Příklad real-time PCR monitorované barvivem SYBR [®] Green na přístroji ABI Prism 7000 Sequence Detection System.....	59
Obr. 6 - Princip alelické diskriminace SNP při real-time PCR s použitím 5' nukleázové TaqMan [®] assay.....	74
Obr. 7 - Mechanismus, kterým diabetes mellitus (DM) může ovlivňovat tkáň parodontu.....	91
Obr. 8 - Mechanismus, kterým parodontitida může ovlivňovat diabetes mellitus (DM).....	92

10. Seznam tabulek

Tab. 1 - Interleukin-18 - demografický popis studovaných osob s chronickou parodontitidou (CP) a zdravých kontrol.....	85
Tab. 2 - Sekvence primerů, velikosti fragmentu a restrikční enzymy použité při analýze jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18).....	87
Tab. 3 - Alelické a genotypové frekvence tří jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18) u kontrol a pacientů s chronickou parodontitidou (CP).....	88
Tab. 4 - Haplotypové frekvence 3 jednonukleotidových polymorfizmů (SNPs) v genu pro interleukin-18 (IL-18) u kontrol a pacientů s chronickou parodontitidou (CP)	89
Tab. 5 - Interleukin-1 - demografický popis studovaných osob s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol.....	95
Tab. 6 - Interleukin-1 genotypové a alelické frekvence u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol.....	98
Tab. 7 - Párová vazebná analýza pro všechna porovnání mezi třemi polymorfizmy v interleukin-1 (IL-1) genovém klasteru u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol	99
Tab. 8 - Haplotypové frekvence v interleukin-1 (IL-1) genovém klasteru u pacientů s chronickou parodontitidou (CP), diabetem mellitem 1. typu (T1DM) a 2. typu (T2DM) s/bez CP a kontrol.....	100

11. Seznam příloh

Příl. 1 - Publikace „Interferon- γ +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria”	145
Příl. 2 - Publikace „Apolipoprotein E gene polymorphisms in relation to chronic periodontitis, periodontopathic bacteria and lipid levels”	152
Příl. 3 - Publikace „The effect of IL-4 polymorphisms on cytokine production in patients with chronic periodontitis and healthy controls”	173
Příl. 4 - Publikace „Diabetes mellitus a orální zdraví”	191

12. Seznam odborných publikací autora

Publikace v časopisech s impakt faktorem (IF)

1. Volčková M*, Bořilová Linhartová P*, Trefná T, Vlažný J, Musilová K, Kukletová M, Kukla L, Izakovičová Hollá L. Lack of association between lactotransferrin polymorphism and dental caries. *Caries Res.* 2014;48:19-44. doi:10.1159/000351689. **IF 2.328**
* Autoři stejným dílem přispěli k této práci.
2. Linhartová P, Černochová P, Izakovičová Hollá L. IL1 gene polymorphisms in relation to external apical root resorption concurrent with orthodontia. *Oral Dis.* 2013;19(3):262-270. ISSN 1601-0825. doi:10.1111/j.1601-0825.2012.01973.x. **IF 2.377**
3. Bořilová Linhartová P, Vokurka J, Poskerová H, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Haplotype analysis of interleukin-8 gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2013; Article ID 342351, 8 pages. dx.doi.org./10.1155/2013/342351. **IF 3.882**
4. Izakovičová Hollá L, Bořilová Linhartová P, Hrdličková B, Marek F, Dolina J, Řihák V, Kala Z. Haplotypes of the IL-1 gene cluster are associated with gastroesophageal reflux disease and Barretts esophagus. *Hum Immunol.* 2013;74(9):1161-1169. ISSN 0198-8859. doi:10.1016/j.humimm.2013.06.026. **IF 2.298**
5. Máchal J, Vašků A, Hlinomaz O, Linhartová P, Groch L, Vítovec J. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both number of diseased vessels and extent of coronary artery disease in Czech patients with CAD. *Biomed Pap.* 2012;156(2):151-158. ISSN 1213-8118. doi:10.5507/bp.2012.051. **IF 0.702**
6. Izakovičová Hollá L, Hrdličková B, Linhartová P, Fassmann A. Interferon-gamma +874A/T polymorphism in relation to generalized chronic periodontitis and the presence of periodontopathic bacteria. *Arch Oral Biol.* 2011;56(2):153-158. ISSN 0003-9969. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.09.005. **IF 1.603**

Publikace v časopisech bez IF

1. Poskerová H, Bořilová Linhartová P, Vokurka J, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Diabetes mellitus a orální zdraví. *Česká stomatologie.* 2014. Accepted for publication, 2014.

Konferenční abstrakta

Přednášky v angličtině

1. Linhartová P, Řehka V, Bartáková V, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Association of Interleukin-8 Gene Polymorphisms with Periodontitis and Subgingival Bacterial Colonization in the Czech Population. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita. 2011. Brno. ISBN 978-80-210-5594-0.*
2. Bartáková V, Tanhäuserová V, Pácal L, Kuricová K, Linhartová P, Kaňková K. Diabetic nephropathy - Pharmacogenomics and variability in genes of renin-angiotensin-aldosterone system. *XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita. Brno. 2011. ISBN 978-80-210-5594-0.*
3. Linhartová P, Lochman J, Krejčí P, Matalová E, Míšek I, Šerý O. Hypodontia: Molecular analysis of PAX9 gene. *XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů. Brno: Masarykova univerzita. Brno. 2010. ISBN 978-80-210-5164-5.*

Přednášky v češtině

1. Bořilová Linhartová P, Máchal J, Bártová J, Poskerová H, Vokurka J, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Variabilita v genu pro apolipoprotein E a její vztah k lipidovému profilu u pacientů s parodontitidou. *19. konference českých a slovenských patofyziologů s mezinárodní účastí. Brno. 2013. ISBN 978-80-905337-3-8.*
2. Izakovičová Hollá L, Bořilová Linhartová P, Hrdličková B, Marek F, Dolina J, Řihák V, Kala Z. Asociace polymorfizmů v genech pro interleukin-1 s gastroezofageální refluxní chorobou jícnu a jejími komplikacemi. *19. konference českých a slovenských patofyziologů s mezinárodní účastí. Brno. 2013. ISBN 978-80-905337-3-8.*
3. Bořilová Linhartová P, Volčková M, Trefná T, Vlažný J, usilová K, Kukletová M, Kukla L, Izakovičová Hollá L. Polymorfizmy v genu pro laktoferin a jejich vztah k rozvoji zubního kazu. *9. Jindřichohradecké pedostomatologické dny. Jindřichův Hradec. 2013.*
4. Valíková P, Bořilová Linhartová P, Černochová P, Izakovičová Hollá L. Variabilita v genu pro receptor vitamínu D (VDR) u pacientů se zevní apikální kořenovou resorpcí. Pilotní studie. *9. Jindřichohradecké pedostomatologické dny. Jindřichův Hradec. 2013.*

5. Bartošová M, Bořilová Linhartová P, Trefná T, Vlažný J, Musilová K, Kukletová M, Kukla L, Izakovičová Hollá L. Polymorfizmus 140A/G v genu pro laktotransferin a jeho vztah k rozvoji zubního kazu a gingivitidy u dětí. *Den výzkumných prací*. 2013.
6. Vlažný J, Trefná T, Bořilová Linhartová P, Volčková M, Izakovičová Hollá L. Role polymorfismu v genu pro laktoferin při vzniku zubního kazu. *57. Studentská vědecká konference, Brno*. Brno. 2013.
7. Kuricová K, Tanhäuserová V, Bartáková V, Linhartová P, Pácal L, Svojanovský J, Krusová D, Olšovský J, Bělobrádková J, Řehořová J, Kaňková K. Význam RAGE polymorfizmů v progresii diabetické nefropatie. *XV. celostátní konference DNA diagnostiky*. Praha. 2011. ISSN 0008-7335.
8. Izakovičová Hollá L, Hrdličková B, Linhartová P, Fassmann A, Augustín P, Vokurka J, Poskerová H, Kukletová M, Musilová K, Pantučková P, Černochová P. Molekulárně biologická analýza genů u vybraných patologických stavů v dutině ústní. *Symposium XIII. Brněnské dentální a implantologické dny, přednáškové dny LF MU*. Brno. 2011. ISBN 978-80-210-5446-2.

Postery

1. Bořilová Linhartová P, Máchal J, Bártová J, Poskerová H, Vokurka J, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Apolipoprotein E gene polymorphisms in chronic periodontitis. *38th FEBS CONGRESS 2013*, St. Petersburg, Russia. 2013. *FEBS J*, 2013;280(1):457. ISSN 1742-4658. doi:10.1111/febs.12340/pdf. **IF 4.25**
2. Bartošová M, Bořilová Linhartová P, Vlažný J, Trefná T, Musilová K, Kukletová M, Kukla L, Izakovičová Hollá L. Lactotransferrin gene polymorphism in children dental caries. *FDI 2013 Annual World Dental Congress*, Istanbul, Turkey. 2013. *Int Dent J*. 2013;63(2):33-34. ISSN 0020-6539. **IF 1.04**
3. Bořilová Linhartová P, Vokurka J, Poskerová H, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Haplotype analysis of interleukin-8 polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis. *15th International Congress of Immunology*, Milan, Italy. 2013. *Front Immunol, Conference Abstract*. 2013. ISSN 1664-3224.

4. Bártová J, Bořilová Linhartová P, Podzimek Š, Svobodová K, Janatová T, Fassmann A, Dušková J, Izakovičová Hollá L. Immune mechanisms in periodontitis - effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production. *15th International Congress of Immunology*, Milan, Italy. 2013. *Front Immunol, Conference Abstract*. 2013. ISSN 1664-3224.
5. Izakovičová Hollá L, Bořilová Linhartová P, Máchal J, Bártová J, Poskerová H, Vokurka J, Fassmann A. Apolipoprotein E gene polymorphisms in chronic and aggressive periodontitis. *2nd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology*. Opatija, Croatia. 2013.
6. Bártová J, Bořilová Linhartová P, Podzimek Š, Svobodová K, Janatová T, Švéda O, Fassmann A, Dušková J, Běláček J, Izakovičová Hollá L. Effect of IL-4 gene polymorphisms on cytokine production for patients with periodontitis and healthy controls. *2nd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology*. Opatija, Croatia. 2013.
7. Bořilová Linhartová P, Poskerová H, Kaňková K, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Vztah polymorfizmů v genu pro interleukin-1 k onemocnění chronickou parodontitidou a diabetes mellitus. *19. konference českých a slovenských patofyziologů s mezinárodní účastí*. Brno. 2013. ISBN 978-80-905337-3-8.
8. Tanhäuserová V, Bartáková V, Kuricová K, Pácal L, Linhartová P, Svojanovský J, Krusová D, Štěpánková S, Olšovský J, Bělobrádková J, Řehořová J, Ott J, Kaňková K. Určení rizikových genetických faktorů u diabetické nefropatie kombinací multilokusové analýzy a analýzy přežívání – výsledky pilotní studie. *Diabetologie metabolismus endokrinologie výživa, 48. Diabetologické dny v Luhačovicích, 2012*. Luhačovice. 2012. ISSN 1211-9326.
9. Linhartová P, Kaňková K, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with chronic periodontitis and diabetes mellitus. *10th Cytokines and Inflammation Conference*, San Diego, CA, USA. 2012.
10. Linhartová P, Řehka V, Jurajda M, Fassmann A, Izakovičová Hollá L. Interleukin-8 gene variations associated with subgingival bacterial colonization in chronic and aggressive periodontitis in the Czech population. *Europario 7*, Vienna, Austria. 2012. doi:10.1111/j.1600-051x-2012.01890.x.

11. Izakovičová Hollá L, Linhartová P, Bučková D, Vokurka J, Fassmann A. Haplotype analysis of the IL-10 promoter polymorphisms and microbial composition in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Europerio 7*, Vienna, Austria. 2012. doi:10.1111/j.1600-051x-2012.01890.x.
12. Linhartová P, Marek F, Kala Z, Izakovičová Hollá L. Interleukin-1 Gene Polymorphisms Associated with Reflux Oesophagitis in the Czech Population. *15th International Congress of Mucosal Immunology*, Paris, France. 2011.
13. Máchal J, Vašků A, Hlinomaz O, Linhartová P, Groch L. Apolipoprotein E $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype as a predictor of angiographic parameters in Czech patients with coronary artery disease. *EAS 2011 Satellite Meeting: Genetics and Epidemiology of Cardiovascular Disease*. Copenhagen, Denmark 2011.
14. Máchal J, Vašků A, Hlinomaz O, Linhartová P, Groch L. Apolipoprotein E $\epsilon 2/\epsilon 3$ Genotype Is Associated with Lower Use of Lipid-lowering Drugs in Czech Patients With Coronary Artery Disease. *9th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD)*. Venice, Italy. 2011.
15. Linhartová P, Černochová P, Raudenská M, Lipková J, Izakovičová Hollá L. Interleukin-1 gene variations in post-orthodontic external root resorption. *XV. celostátní konference DNA diagnostiky*. Praha. 2011. ISSN 0008-7335.
16. Tanhäuserová V, Bartáková V, Kuricová K, Pácal L, Linhartová P, Svojanovský J, Krusová D, Štěpánková S, Olšovský J, Bělobrádková J, Řehořová J, Ott J, Kaňková K. Pilot application of multi-locus and time-to-event analysis to ascertain genetic risk factors for diabetic nephropathy and related adverse outcomes of diabetes mellitus. *Diabetologia, 47th EASD Annual Meeting*. Lisbon, Portugal. 2011. ISSN 0012-186X.

13. Souhrn poznatků disertační práce

Součástí disertační práce koncipované jako komentovaný soubor prací jsou 3 recenzované prvoautorské zahraniční publikace s IF, které jsou základem tří kapitol zabývajících se genetickou variabilitou kandidátních genů u vybraných onemocnění dutiny ústní. I když se nám nepodařilo prokázat asociaci SNP v genu pro laktoferin s rozvojem a/nebo závažností zubního kazu u českých dětí³⁴, krátká alela v IL-1RN genu se u dívek ukázala jako riziková pro vznik EARR.⁷⁷ U pacientů s CP jsme některé IL-8 haplotypy shledali jako protektivní a současně jsme asociovali určité SNPs v IL-8 genu s výskytem konkrétních bakterií u zdravých kontrol, pacientů s AgP nebo pacientů s CP.¹⁷⁰ U onemocnění parodontu jsme zkoumali vztahy i několika dalších polymorfizmů v genech pro imunoregulační faktory k CP v české populaci; ty se staly podkladem pro 2 publikace, které jsou nyní v recenzním řízení. Aktuálně pracujeme na dokončení publikace o variabilitě v IL-1 genovém klasteru u pacientů s CP a u pacientů s diabetem mellitem s/bez CP, kde dosavadní předběžné výsledky naznačují rizikovost určitých haplotypů pro daná onemocnění. Komplexní charakter všech zmíněných chorob dutiny ústní však vyžaduje další studium, ve kterém budou na genetické analýzy navazovat klinická, mikrobiologická a biochemická vyšetření.

.....
Mgr. Petra Bořilová Linhartová

.....
Prof. MUDr. Lydie Izakovičová Hollá, Ph.D.