

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Barbora Těšínská**

Komplexní charakterizace subgingiválního plaku - využití moderních sekvenačních metod v diagnostice a sledování léčby onemocnění parodontu

Complex characterization of subgingival plaque - use of modern sequencing methods in diagnostics and monitoring of treatment of periodontal diseases

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Najmanová, Ph.D.

Praha 2018

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat své školitelce Mgr. Lucii Najmanové Ph.D. za odborný dohled, vecné rady a připomínky, ale také za ochotu a trpělivost, kterou mi v průběhu psaní mé diplomové práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Magdaléně Pavlíkové za přátelský přístup, pomoc a cenné rady, a také za poskytnutá data pro zpracování části této práce. Mé poděkování za poskytnutá data patří také Mgr. Lence Sabové. Děkuji také Danieli Moraisovi Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením dat a MUDr. Jaroslavu Myšákovi a Mgr. Táně Janatové za zprostředkování odběru vzorků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také mé rodině za finanční i duševní podporu a především trpělivost po celou dobu mého studia. Obrovské děkuji za podporu a trpělivost patří také mému partnerovi.

Tato práce byla částečně podpořena z projektu Agentury pro zdravotnický výzkum č. 17-30753A

## Abstrakt

Parodontitida je multifaktoriální zánětlivé onemocnění, které v konečném důsledku může vést až ke ztrátě celého chrupu. Hlavní příčinou tohoto onemocnění je akumulace bakterií zubního plaku a následná masivní reakce imunitního systému. Je prokázáno, že složení orálního mikrobiomu se liší u parodontálně zdravých osob a pacientů s parodontitidou. Tato práce řeší dílčí části dlouhodobého projektu, který se zabývá složením a dynamikou orálního mikrobiomu parodontálně zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní formou tohoto onemocnění. Charakterizace orálního mikrobiomu je prováděna na základě sekvenování bakteriální 16s rDNA. Z výsledků je patrné, že změna ve složení orálního mikrobiomu nastává ještě před projevem klinických příznaků onemocnění, a že precizní dentální hygiena může nástup onemocnění značně oddálit či možná dokonce zastavit. Při porovnávání složení orálního mikrobiomu osob s chronickou a agresivní parodontitidou nebyly patrné výrazné rozdíly vysvětlující rychlejší progresi agresivní formy onemocnění. Dílčím úkolem této práce bylo porovnání výsledků získaných sekvenačními metodami 454 pyrosekvenování a Illumina. Výsledky získané oběma metodami se statisticky neliší, a proto v rámci dlouhodobé studie lze navázat metodou Illumina na již získané výsledky metodou 454 pyrosekvenování. Na základě analýzy výsledků sekvenace byly navrženy dva parametry pro predikci rizika vzniku a rozvoje onemocnění a také pro monitorování úspěšnosti léčby.

**Klíčová slova:** parodontitida, orální mikrobiom, sekvenování, bakterie červeného komplexu, prevence, diagnostika parodontitidy

## **Abstract**

Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease which can result in a complete loss of teeth. Its main cause is the accumulation of bacteria from the dental plaque followed by massive reaction of the host immune system. It was proved that the composition of oral microbiome (OM) differs in periodontally healthy individuals and patients with periodontitis. This work aims to solve specific parts of the long-term project concerning the taxonomic composition of the OM of periodontally healthy individuals and patients with chronic and aggressive form of the disease. The OM was characterized based on 16s rDNA sequencing. It is evident from the results that the shift in the OM composition occurs prior the development of clinical signs of the disease and that the precise dental care can significantly postpone or even avoid the onset of the disease. When comparing the OM composition in individuals with chronic and aggressive periodontitis, no remarkable differences were detected to explain the faster progress of the aggressive form of the disease. This work also aimed to compare the results obtained by 454 pyrosequencing and Illumina. Both sequencing methods were found to provide statistically comparable results. Illumina MiSeq thus can be employed to build on the former results of the long-term study obtained by 454 pyrosequencing. Based on our results the two parameters for periodontitis prediction as well as monitoring of the treatment were proposed.

**Keywords:** periodontitis, oral microbiome, sequencing, red complex bacteria, prevention, diagnosis of periodontitis

## Obsah

1.	Úvod.....	10
2.	Přehled literatury.....	12
2.1	Zánětlivé parodontopatie.....	12
2.1.1	Gingivitida.....	13
2.1.2	Parodontitida .....	14
2.2	Bakterie .....	28
2.2.1	Tvorba zubního plaku.....	29
2.2.2	Vlastnosti bakteriálního biofilmu .....	30
2.2.3	Dysbióza.....	31
2.2.4	Orální mikrobiom spojený s parodontálním zdravím a s parodontitidou..	32
2.2.5	Faktory virulence.....	44
2.2.6	Funkční vlastnosti mikrobiálních komunit.....	48
2.3	Diagnostika parodontitidy .....	49
2.3.1	Klinické a rentgenologické vyšetření .....	49
2.3.2	Mikrobiologické diagnostické testy .....	50
3.	Dosavadní výsledky .....	58
4.	Cíle práce .....	64
5.	Materiál a metody .....	65
5.1	Materiál .....	65
5.1.1	Charakterizace souborů testovaných osob .....	65

5.1.2	Komerční soupravy .....	69
5.1.3	Enzymy, standardy, chemikálie.....	69
5.1.4	Primery .....	69
5.1.5	Použité programy .....	71
5.2	Metody .....	71
5.2.1	Odběr vzorků .....	71
5.2.2	Izolace DNA.....	71
5.2.3	Příprava knihovny pro sekvenování .....	72
5.2.4	Izolace a přečištění PCR produktů .....	74
5.2.5	Zakoncentrování DNA .....	74
5.2.6	Měření koncentrace DNA ve vzorku.....	74
5.2.7	Sekvenační analýza .....	74
5.2.8	Vyhodnocení sekvenačních dat .....	74
5.2.9	Statistická analýza a grafické vyhodnocení.....	76
6.	Výsledky .....	80
6.1	Sekvenační statistika .....	80
6.2	Posouzení komparability výsledků charakterizace orálního mikrobiomu získaných dvěma různými sekvenačními metodami (454 pyrosekvenování a Illumina).....	82
6.3	Sledování časového vývoje orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob - pokračování dlouhodobé studie .....	83
6.4	Porovnání taxonomické kompozice orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou .....	88
7.	Diskuze .....	98

8.	Souhrn.....	111
9.	Seznam použité literatury .....	112



## **Seznam zkratek**

**IL-** interleukin

**OM-** oral microbiome (orální mikrobiom)

**PCR-** polymerázová řetězová reakce

**SRP-** scaling and root planing (metoda používaná při léčbě parodontitidy)

**TNF- $\alpha$ -** tumor nekrotizující faktor alfa

## 1. Úvod

Parodontitida je zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubu neboli parodontu. Hlavní příčinou toho onemocnění jsou bakterie zubního plaku, bakteriálního biofilmu, který ulpívá na zubech a dásních. Pokud není tento plak řádně a pravidelně odstraňován, dochází k jeho akumulaci, což vyvolá masivní reakci imunitního systému. Složky imunitního systému pak spolu s bakteriemi způsobují destrukci parodontálních tkání a vznik tzv. parodontálního chobotu. Konečným důsledkem parodontitidy je ztráta postiženého zubu, potažmo celého chrupu. Parodontitidou trpí přibližně každý druhý dospělý člověk starší 40 let a představuje hlavní příčinu ztráty chrupu u dospělých. Navzdory pokrokům v našich znalostech o příčinách a rizikových faktorech spojených s parodontitidou, neexistují žádné známky poklesu prevalence tohoto onemocnění. Parodontitida představuje celosvětový problém, neboť její léčba je finančně velmi nákladná a ztráta chrupu snižuje společenské uplatnění postižených jedinců.

Mikrobiologie parodontitidy je předmětem intenzivního vyšetřování již po několik desetiletí. Výzkumy již v minulosti prokázaly, že složení orálního mikrobiomu se liší u zdravých osob a pacientů s parodontitidou. Řada nových poznatků však přišla až v důsledku technologického pokroku v molekulárních technikách, které umožňují vysoce výkonnou analýzu velkého počtu vzorků a obcházejí některá omezení kultivačních technik. Řadu informací přinesl zejména vývoj sekvenačních metod, které umožňují komplexní pohled na všechny bakterie přítomné v daném vzorku. A právě sekvenační metody jsou využívány v dlouhodobé studii, jíž je tato diplomová práce součástí. Tato studie se zabývá složením a dynamikou orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob, ale také osob s chronickou a nově i agresivní formou parodontitidy. V rámci této diplomové práce byl sledován vývoj orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a dále bylo charakterizováno a porovnáno složení orálního mikrobiomu u pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou. Vzhledem k tomu, že v průběhu dlouhodobé studie bylo nutné přejít ze sekvenační metody 454 pyrosekvenování na metodu Illumina, bylo dílčím úkolem této práce také porovnat výsledky získané těmito metodami a vyhodnotit, zda je možné na výsledky získané metodou 454 pyrosekvenování navázat metodou Illumina, aniž by z důvodu změny sekvenační metody došlo ke zkreslení výsledků.

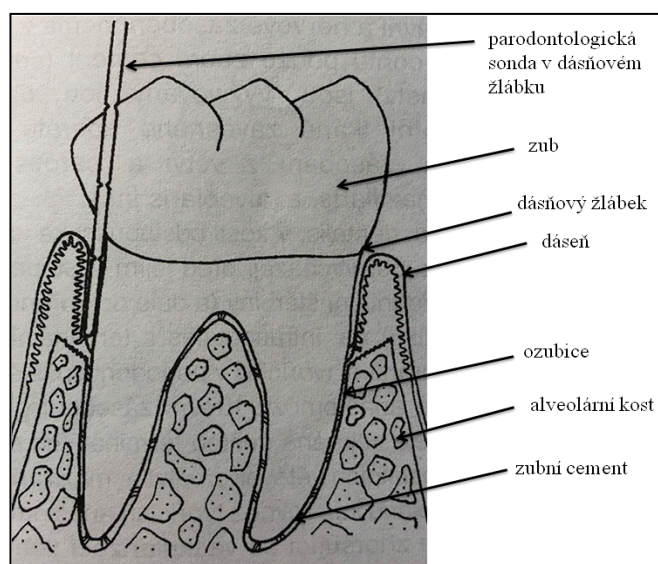
Diagnostika parodontitidy se v současné době opírá především o klinické a rentgenologické vyšetření, které sice odhalí již probíhající onemocnění, ale neumožňuje u

parodontálně zdravých osob předpovědět možné budoucí riziko vzniku parodontitidy. Z tohoto důvodu bylo hodnoceno také možné využití sekvenačních metod a charakterizace orálního mikrobiomu pro diagnostiku, predikci rizika vzniku onemocnění a sledování průběhu léčby.

## 2. Přehled literatury

### 2.1 Zánětlivé parodontopatie

Termín parodontopatie označuje poruchy funkce a struktury závěsného aparátu zubu neboli parodontu. Parodont (ze starořečtiny řečtiny *para-* okolo, *odous-* zub) je komplex struktur a tkání obklopujících zub (Mozorova 2016). Je tvořen dásní (*gingiva*), zubním cementem, alveolární kostí a ozubicí (*periodoncium*), viz obr. 1. Dáseň je měkká tkáň pokrývající alveolární kost a obepínající zub v místě krčku. Zdravá dáseň má světle růžovou barvu, u lidí s tmavší pletí je hnědě pigmentována. Prostor mezi dásní a krčkem zubu se nazývá dásňový žlábek (*sulcus gingivalis*), je vystlán spojovacím epitelem a u zdravých jedinců se jeho hloubka pohybuje v rozmezí 0,1-3 mm. Zubní cement je tvrdá tkáň, která pokrývá zub v oblasti kořene. Jeho hlavní funkce je ukotvení zubu v alveolu a spojení periodontálních vláken s povrchem kořene. Výběžek alveolární kosti tvoří část horní a dolní čelisti, ve které jsou umístěny zuby, jeho funkcí je nést zuby a poskytnout jim oporu. *Periodoncium* vyplňuje periodontální štěrbinu (prostor mezi cementem kořene zubu a alveolární kostí), jde o periodontální vazivová vlákna, na nichž je zub v lůžku zavěšen.



**Obrázek 1** Stavba parodontu  
Převzato a upraveno podle Slezák 1995

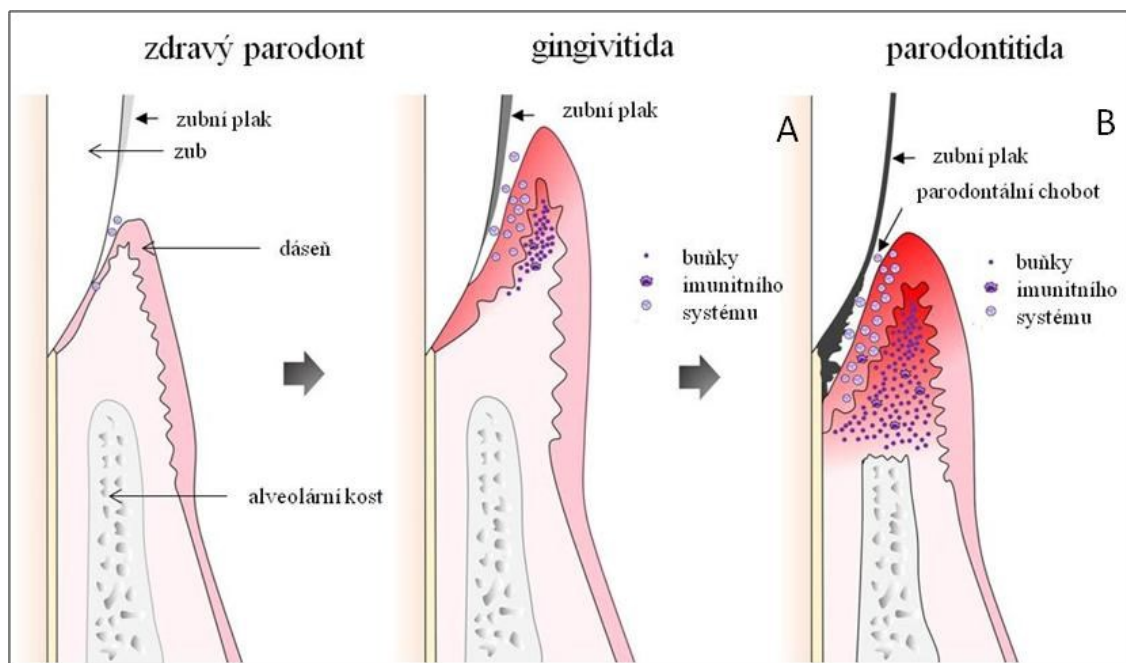
Hlavními funkcemi parodontu je ukotvení zubu, obrana proti vnějším vlivům, tlumení žvýkacích sil a oddělení kořene zubu od prostředí dutiny ústní. Působením různých vlivů dochází k poškození těchto struktur, což může mít za následek až ztrátu chrupu. Nejčastější formou parodontopatií jsou onemocnění zánětlivého původu, tedy gingivitida a parodontitida. (Dostálová a kol. 2008, Mozorova 2016)

### 2.1.1 Gingivitida

Gingivitida, neboli zánět dásní je infekce vyvolaná bakteriemi zubního plaku, který ulpívá na zubech a dásních. Zubní plak je organizovaný bakteriální biofilm, který se skládá především z bakterií, glykoproteinů a polysacharidů. Dle lokalizace rozlišujeme dva typy zubního plaku, a to supragingivální, který adhezuje na zubní sklovinu nad okrajem dásně, a subgingivální, který se šíří do dásňového žlábků. Oba typy mají do jisté míry rozdílnou strukturu a složení. Při správném a pravidelném čištění chrupu je zubní plak udržován v nezralém stavu a v relativně malém množství. (Slezák 1995, Wade 2013) Pokud není pravidelně odstraňován, mohou se v něm ukládat minerální látky ze slin (zejména vápník a fosfor) a vzniká tak zubní kámen. Zatímco zubní plak lze zpravidla odstranit při běžném čištění zubů, zubní kámen je možné odstranit pouze speciálními nástroji v zubní ordinaci. (Slezák 1995)

Při nedostatečné dentální hygieně se zubní plak (popř. zubní kámen) hromadí na okraji dásňového žlábků, což vyvolá odpověď imunitního systému, podráždění dásní a jejich zánět (Slezák 1995), viz obr. 2A. Dásně jsou zarudlé, zduřelé a lesklé. Charakteristické je zvýšené množství sulkulární tekutiny a přítomnost tzv. nepravých parodontálních chobotů způsobených zvětšením dásňového žlábků. Sulkulární tekutina obsahuje obranné látky imunitního systému, ale je také zdrojem živin pro bakterie. Zprvu dásně krvácejí pouze při podráždění, např. při čištění chrupu či konzumaci tvrdé stravy, později mohou krváčet i spontánně. Gingivitida většinou nebolí, což je důvod, proč je pacienty často přecházena. Hluběji uložené tkáně parodontu nejsou postiženy. Léčba spočívá v dokonalém odstranění zubního plaku a správné dentální hygieně, včetně čištění mezizubních prostor. Pokud není gingivitida včas a řádně léčena, může přejít v parodontitidu. Obecně platí, že ne každá gingivitida se rozvine v parodontitidu, ale každé parodontitidě předcházela gingivitida. Zatímco gingivitida je vratný proces, parodontitida se od okamžiku ztráty alveolární kosti

stává stavem nevratným, který v konečném důsledku může vést až ke ztrátě chrupu. (Škach 1984, Mozorova 2016).



**Obrázek 2** Vývoj parodontitidy  
Převzato a upraveno podle Kriebel a kol. 2018

### 2.1.2 Parodontitida

Při parodontitidě jsou postiženy nejenom dásně, ale postupně dochází k poškození celého závěsného aparátu zubu, viz obr. 2B. Podrážděné a oteklé dásně při jejich zánětu neposkytují dostatečně efektivní těsnění mezi zubem a vnějším prostředím a supragingivální plak se tak může snáze šířit do dásňového žlábků. (Slezák 1995, Mozorova 2016) Zatímco v supragingiválním plaku dominují spíše grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie (streptokoky, aktinomycety), v tom subgingiválním převažuje anaerobní gramnegativní flóra a řada těchto bakterií má proteolytický metabolismus (Moore a kol. 1982, Zijngje a kol. 2010). Působením bakteriálních toxinů, enzymů a dalších virulenních faktorů (peptidoglykan, produkty metabolismu bakterií...) dochází k postupnému poškození a destrukci spojovacího epitelu a parodontálních vláken. Přítomnost bakterií navíc vyvolává masivní obrannou reakci imunitního systému, což způsobí zvýšené vyplavování zánětlivých mediátorů do tkání a jejich další poškození (Teles a kol. 2013). Postiženy však nejsou pouze měkké tkáně parodontu.

Zánětlivý infiltrát a bakteriální produkty způsobují také resorpci alveolární kosti, a tedy úbytek kostní hmoty. Působením všech těchto faktorů postupně vzniká hluboká kapsa tzv. parodontálním chobot- typický projev parodontitidy, jehož hloubka může být i více než 10 mm. Uvnitř tohoto chobotu se nachází oloupané epitelie, odumřelé bakterie, živé a metabolizující bakterie, granulační tkáň, leukocyty a zánětlivý exsudát (Slezák 1995). Rozlišujeme dvě základní formy parodontitidy, a to chronickou a agresivní (podrobněji se rozdílů mezi těmito formami věnuje kapitola 2.2.4.1.)

### **2.1.2.1 Projevy parodontitidy**

Klinicky se parodontitida projevuje přítomností parodontálních chobotů s hloubkou více než 3 mm a resorpcí alveolární kosti, která je patrná při rentgenologickém vyšetření. Mezi další příznaky patří ústup dásně a odhalování krčků zubů, které mohou být zvýšeně citlivé. Dalším příznakem může být nepříjemný zápach z úst a někteří pacienti mohou pociťovat i nepříjemné pocity brnění, tlaku či bolesti. Může docházet i ke krvácení či hnisavé exsudaci z parodontálních chobotů. Při pokročilejších stádiích parodontitidy dochází k zvýšené viklavosti zubů a k jejich migraci. Konečným stádiem u neléčené parodontitidy je ztráta zubu, potažmo celého chrupu. (Slezák 1995)

### **2.1.2.2 Příčiny parodontitidy**

Parodontitida je multifaktoriální onemocnění. V roce 1994 Haffajee a Socransky popsali, že pro vznik a progresi této nemoci je nutný současný výskyt hned několika faktorů, a to: virulentní parodontální patogen, vhodné lokální prostředí a vnímavost hostitele. Později byl tento model rozšířen ještě o přínos genetických a získaných rizikových faktorů. Bakterie jsou nutnou, ale ne dostatečnou podmínkou k vyvolání onemocnění. Další nutnou podmínkou je přítomnost zánětu. Bakterie a imunologická zánětlivá odezva hostitele jsou tedy klíčovými prvky etiologie a patogeneze parodontálního onemocnění, ale ani jeden tento faktor nezpůsobí zničení parodontálních tkání sám. (Teles a kol. 2013). Zatímco bakterie jsou zodpovědné za zahájení destrukce parodontálních tkání, hlavní podíl je důsledkem nepřímého poškozování zprostředkovaného imunologickou zánětlivou odezvou (Teles a kol. 2013, Larsen a Fiehn 2017).

### **2.1.2.2.1 Bakterie**

V ústní dutině se může vyskytovat až 700 druhů bakterií a řada studií již prokázala, že složení bakteriálního biofilmu je u osob parodontálně zdravých a u osob s parodontitidou odlišné (Socransky a kol. 1998, Griffen a kol. 2012, Abusleme a kol. 2013, Kirst a kol. 2015, Szafranski a kol. 2015). U parodontálně zdravých osob v zubním plaku dominují převážně streptokoky a aktinomyceety a tento plak je pro člověka spíše výhodný. Poskytuje ochranu před kolonizací exogenními patogenními bakteriemi a interaguje s imunitním systémem na úrovni slučitelné se zdravím. Tato rovnováha se nazývá homeostáza. Zráním biofilmu a působením dalších vlivů může dojít ke změně podmínek, posunu ve složení biofilmu a narušení vztahu s hostitelem, tedy k dysbióze. Dochází ke změnám v poměrném zastoupení přítomných taxonů a začínají převažovat taxony, které mohou iniciovat onemocnění (Larsen a Fiehn 2017). Tyto bakterie označujeme jako parodontální patogeny a mezi nejvýznamnější z nich patří *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* a *Tannerella forsythia* (Socransky a kol. 1998). Parodontitida však není klasická infekční nemoc vyvolaná jedním určitým patogenem, ale jde spíše o dynamický proces způsobený celými patogenními mikrobiálními komunitami (Li a kol. 2014, Mira a kol. 2017). Vlivu bakterií se podrobně věnuje kapitola 2.2..

### **2.1.2.2.2 Imunitní systém**

Imunitní odpověď hostitele na působení patogenních mikroorganismů zahrnuje komplex buněčných a humorálních složek imunitního systému, které na sebe navzájem působí. První obranná reakce začíná již v oblasti dásně. Žírné buňky nacházející se kolem krevních kapilár uvolňují histamin a heparin, čímž navodí vasodilataci a zvýšení propustnosti krevních kapilár. Vzniká místní otok tkáně. Dále dochází k aktivaci komplementového systému. Jde o systém bílkovin, které se podílejí na zánětlivých procesech a podporují fagocytózu. Antigen prezentující buňky (např. makrofágy) fagocytují bakterie a produkují cytokiny, například interleukin-1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) a tumor nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ ). IL-1 a TNF- $\alpha$  patří mezi nejdůležitější prozánětlivé cytokiny, indukují například uvolnění enzymu kolagenázy z různých pojivových buněk (např. fibroblastů), způsobují poškození subgingivální tkáně a úbytek kostní hmoty. Dále jsou aktivovány T-lymfocyty, které jsou schopny neutralizovat prostupující antigeny. Vlivem cytokinů jsou stimulovány též B-lymfocyty k produkci protilátek a hematopoetické buňky kostní dřeně k produkci a zrání



dalších imunokompetitivních buněk. Aktivované makrofágy vylučují další cytokiny, prostaglandiny a faktory komplementového systému, které zpětně působí na další makrofágy, T a B lymfocyty a buňky kostní dřeně. Důsledkem dlouhodobě přetrvávajícího zánětu v parodontu je jeho další poškození a úbytek parodontálních tkání (Mutschelknaus a kol. 2002). Molekuly produkované buňkami hostitele jsou dokonce silnějšími mediátory parodontální destrukce, nežli produkty bakterií s podobnými účinky, a hladiny těchto mediátorů se v parodontálních lézích vyskytují v mnohem vyšší koncentraci (Teles a kol. 2013).

### **2.1.2.3 Rizikové faktory vzniku parodontitidy**

Určité rizikové faktory hrají důležitou roli při reakci jednotlivce na infekci parodontu a mohou ovlivňovat iniciaci a progresi onemocnění. Identifikace těchto faktorů umožňuje více se zaměřit na prevenci a jejich úprava či eliminace (tam, kde je to možné) může pomoci zmírnit rozsah onemocnění nebo podpořit léčbu. Mezi faktory ovlivňující vznik a průběh parodontitidy patří jak vliv životního stylu (kouření, strava, hygienické návyky...), tak neovlivnitelné faktory jako jsou systémové poruchy, věk, genetická predispozice, anatomické odchylky chrupu a další.

#### **2.1.2.3.1 *Dentální příčiny***

Nepravidelné uspořádání chrupu může znesnadňovat dentální hygienu a vést tak k nadměrné retenci zubního plaku a zvýšenému dráždění tkání. Jsou-li navíc některé zuby více zatěžovány vlivem špatného skusu, dochází při parodontitidě ke zvýšené resorpci alveolární kosti a tedy k rychlejší ztrátě zubu. Dalším rizikovým faktorem může být také atypický úpon retní uzdičky nebo takzvané mělké vestibulum (prostor mezi dolním rtem a dásňovým žlábkem) kdy je mechanickým tahem poškozen dentogingivální uzávěr a tím je usnadněno pronikání bakterií do gingivální tkáně. (Škach a kol. 1984) Problémy mohou způsobit i špatně zhotovené zubní výplně a protetické náhrady, které mohou mechanicky poškozovat tkáně, ale také na nich může ve zvýšené míře ulpívat zubní plak (Slezák 1995).

#### **2.1.2.3.2 *Chronické dýchání ústy***

Dýchání ústy způsobuje zvýšené sucho v ústech, sliny tak nedostatečně plní svou oplachovací a antibakteriální funkci a bakterie snadněji ulpívají na zubech (Slezák 1995).

### **2.1.2.3.3 Kouření**

Kouření má negativní vliv na řadu onemocnění a ani parodontitida není výjimkou. Dokonce je jedním z nejdůležitějších a nejčastějších rizikových faktorů chronické parodontitidy. Až 40 % případů chronické parodontitidy může souviset s kouřením (Heasman a kol. 2006). Cigaretový kouř obsahuje více než 4000 toxických látek, jako je například nikotin, oxid uhelnatý, kyslíkové radikály a různé karcinogeny. Existuje hned několik mechanismů, kterými působí na parodontální zdraví. Nikotin způsobuje vazokonstrikci cév, vedoucí k tomu, že dásně kuřáků obvykle méně krvácejí a jsou tak skryty projevy gingivitidy. To znesnadňuje včasnou diagnostiku parodontitidy a včasné zahájení léčby. Tento děj také může do jisté míry vysvětlit snížené množství kyslíku v parodontální tkáni a tedy upřednostnění nadměrného růstu anaerobních bakterií, jako je například *T. denticola*, *P. gingivalis* či *T. forsythia*, které jsou považovány za nejvýznamnější parodontální patogeny. Kouření působí také na imunitní systém. Ovlivňuje produkci cytokinů, zvyšuje například produkci TNF- $\alpha$ , který přispívá k destrukci parodontálních tkání, a mimo jiné také inhibuje proliferaci, chemotaxi a připojení fibroblastů (základních buněk vazivové tkáně). Kromě toho, že kouření zvyšuje riziko vzniku parodontitidy a zhoršuje její průběh, má negativní vliv také na její léčbu a hojení parodontálních tkání. Jedním z důvodů je nikotin, který se váže na povrch kořene zubu a znesnadňuje tak regeneraci. (Genco a Borgnakke 2013) Studie ukazují, že odvykání kouření má na léčbu parodontitidy pozitivní vliv a mělo by se tak stát součástí této léčby (Albandar a kol. 2000).

### **2.1.2.3.4 Psychologické faktory**

Stejně jako u jiných onemocnění, i v tomto případě má stres negativní dopad na stav pacienta. Emocionální stres ovlivňuje imunitní systém a náchylnost k infekci. Studie ukázaly, že osoby pod psychickým stresem mají větší pravděpodobnost výraznější ztráty parodontálních tkání a alveolární kosti (Hatem 2012). Jedním z možných důvodů je zvýšená produkce prozánětlivých mediátorů (např. IL-6) u osob pod zvýšenou psychickou zátěží (Kiecolt-Glaser a kol. 2003). Možným důvodem je také to, že vysoce stresované osoby jednoduše tolik nedbají na správnou a pravidelnou ústní hygienu (Hatem 2012).

### **2.1.2.3.5 Obezita**

Obezita představuje jedno z nejvýznamnějších rizik moderní společnosti. Její prevalence se stále zvyšuje a představuje problém zejména u dětí a mladistvých. Obezita je uznávaná jako rizikový faktor mnoha onemocnění, včetně parodontitidy. Příčin je hned

několik. Při obezitě je snížen průtok krve do parodontálních tkání, což podporuje rozvoj parodontálního onemocnění. Dále může zvýšit imunologické či zánětlivé poruchy. Volné mastné kyseliny přispívají nejen k obezitě, ale i k inzulinové rezistenci tím, že zvyšují destrukci  $\beta$  buněk pankreatu. Inzulinová rezistence pak přispívá ke generalizovanému hyperzánětlivému stavu (Hatem 2012). Dalším problémem je, že tuková tkáň produkuje řadu látek, které mají vliv na metabolismus celého těla, včetně imunitního systému. Příkladem jsou leptin, IL-6, TNF- $\alpha$ , adiposin, komplement faktor C3 a angiotensinogen. Mnoho z těchto produktů je vylučováno v poměru k množství přítomné tukové tkáně. Vyrůstající množství tukové tkáně tedy může také indukovat hyperzánětlivou reakci při onemocnění parodontu (Ritchie a Kinane 2003). Na druhou stranu existují určité důkazy o tom, že cytokiny, jako je IL-1 $\beta$  a interferon  $\gamma$ , a lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, které jsou ve velkém množství přítomny při parodontální infekci, mohou interferovat s metabolismem lipidů. To může dále zvyšovat obezitu a zdravotní problémy s ní související (Hatem 2012).

#### **2.1.2.3.6 Sociálně-ekonomický status (SES)**

Mnoho chorobných stavů je spojeno se sociálně-ekonomickým statutem. Obecně platí, že ti, kteří jsou více vzdělaní, movitější a žijí v lepších podmínkách, mají lepší zdravotní stav než chudší vrstvy společnosti. Výjimkou nejsou ani parodontální onemocnění. Gingivitida a špatná ústní hygiena jasně souvisí s nižším SES, ale vztah mezi parodontitidou a SES je méně přímý. (Hatem 2012)

#### **2.1.2.3.7 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus je již řadu let uznávaný rizikový faktor pro vznik a progresi parodontitidy. U diabetiků byla zjištěna vyšší závažnost a rozsah onemocnění. Rozvoj parodontitidy souvisí s délkou onemocnění a mírou kompenzace, u špatně kompenzovaných diabetiků je riziko vzniku parodontitidy 2-3x vyšší (Poskerová a kol. 2014). Hlavní příčinou je dlouhodobá hyperglykemie, která ovlivňuje řadu biochemických reakcí a podmiňuje vznik tzv. pozdních produktů glykace (advanced glycation end products – AGEs). Tyto stabilní proteiny obsahující sacharidy mohou následně ovlivňovat celou řadu dalších buněk a jsou obvykle považovány za hlavní vazbu mezi různými diabetickými komplikacemi. AGEs mohou strukturálně i funkčně poškozovat cévy. Tyto změny redukují průtok krve a snižují možnost migrace leukocytů a imunitních faktorů do postižené tkáně (Mealey a Oates 2006), což posiluje virulenci bakterií a umožňuje jejich rychlejší množení (Poskerová a kol. 2014). Zvýšení permeability kapilár vede k porušení bariérových funkcí a tkáňové integrity, to má za

následek zvýšenou náchylnost k infekci a opožděné hojení ran. Porušen je také metabolismus kolagenu, hlavního strukturálního proteinu závěsného aparátu zubu. Syntéza kolagenu je snížena a navíc je u diabetiků zvýšena hladina kolagenázy, která ho rozkládá. Následkem je rychlejší progresse a pomalejší léčba parodontálních onemocnění. Postiženy jsou také buňky imunitního systému, které jsou vazbou s AGEs aktivovány a syntetizují tak velké množství zánětlivých mediátorů, především IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  způsobujících nepřiměřenou imunitní odpověď. Působením AGEs je negativně ovlivněn i kostní metabolismus. U diabetiků byly zjištěny změny ve složení sulkulární tekutiny, obsahuje vyšší hladinu glukózy, kolagenáz a zánětlivých mediátorů. Všechny uvedené změny usnadňují působení mikroorganismů a zvyšují jejich patogenní potenciál (Mealey a Oates 2006).

#### **2.1.2.3.8 Genetické faktory**

Vliv genetiky je významný zejména u agresivní formy parodontitidy, kdy jsou rodiče, potomci a sourozenci jedinců postižených agresivní parodontitidou považováni za vysoce rizikové pro rozvoj této formy onemocnění (Kinane a Hart 2003). U chronické formy parodontitidy není vliv genetiky stále zcela objasněn.

Studie Shearer a kol. (2011) zahrnující 625 jedinců dospěla k závěru, že rodiče se špatným parodontálním zdravím mají tendenci mít také potomky se špatným parodontálním zdravím. Rodinný vliv však nezahrnuje pouze genetické faktory, ale ovlivňuje také životní styl zahrnující například hygienické či stravovací návyky, které mohou následně ovlivňovat parodontální stav daného jedince. Uvedená studie však nedokázala rozlišit genetické a environmentální faktory. Studie zabývající se vlivem genetiky na parodontitidu se nejvíce zaměřily na polymorfizmy genů, jejichž produkty hrají roli v regulaci imunitního systému (cytokiny, receptory) a v metabolismu parodontálních tkání. Tyto genové polymorfismy mohou vést ke změnám kódovaného proteinu nebo ke změnám v jeho expresi, a ovlivnit tak imunitní reakci a vývoj onemocnění (Gonçalves a kol. 2017). Mezi nejvíce zkoumané geny patří gen pro IL-1 (IL-1 má klíčovou roli ve vrozené i adaptivní imunitě a v patogenezi infekčních onemocnění), kdy je určitý genotyp označován jako pozitivní, asociovaný s parodontitidou. Výsledky studií však nejsou zcela jednoznačné a určení tohoto genotypu jako jasného rizikového faktoru ztěžuje také fakt, že byl prokázán především u bělochů (Heitz-Mayfield 2005, Karimbux a kol. 2012, Razzouk 2016). Další studie naznačují, že polymorfizmy IL-6, IL-10, receptoru vitamínu D, receptoru CD-14 a Fc receptorů imunoglobulinu G (IgG), mohou také hrát roli při rozvoji chronické parodontitidy. Nicméně

výsledky se mohou lišit mezi etnickými skupinami a mohou být také ovlivněny faktory prostředí (Heitz-Mayfield 2005, Nibali a kol. 2009, Genco a Borgnakke 2013, Gonçalves a kol 2017).

Kromě toho, že určité genetické varianty mohou ovlivňovat metabolismus a reakce imunitního systému, mohou pravděpodobně ovlivňovat také bakteriální složení. Například zvýšená zánětlivá odpověď na akumulaci plaku u jedinců nesoucích specifické genové polymorfismy může zvýšit pravděpodobnost přerůstání určitých bakterií, které dobře rostou v zanícených oblastech. Příkladem může být spojitost hyperinflamační genetické varianty IL-6 a zvýšené detekce parodontálních bakterií *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *P. gingivalis* (Nibali a kol. 2009).

#### **2.1.2.3.9 Věk**

Existuje důvodné podezření, že narůstající věk by mohl být rizikovým faktorem pro parodontitidu. V průběhu stárnutí dochází v parodontálních tkáních k řadě fyziologických, biochemických a imunologických procesů, které ovlivňují jejich stav. Tyto změny zvyšují ztrátu parodontální vazby a kostní hmoty u starších pacientů s parodontitidou. Stárnutí funkčně i strukturálně ovlivňuje například fibroblasty, hlavní buňky syntézy parodontálních pojivových tkání. Fibroblasty starších osob vykazují sníženou produkci kolagenu a zároveň zvýšenou rychlost jeho intracelulární fagocytózy, což negativně ovlivňuje rovnováhu mezi syntézou a degradací kolagenu v pojivové tkáni. (Huttner a kol. 2009) S věkem se také trvale snižuje tvorba kostí, což vede ke značné ztrátě kostní hmoty. Je to dáno změnami v diferenciaci a proliferaci osteoblastů a osteoklastů a také endokrinními změnami spojenými s věkem (zvýšené hladiny parathormonu, snížená produkce estrogenu u žen po menopauze, nedostatek vitamínu D a vápníku) (Huttner a kol. 2009, Genco a Borgnakke 2013). Stárnutí ovlivňuje také imunitní systém. Dochází k snížení počtu T a B-lymfocytů, makrofágů, neutrofilů a NK buněk v periferní krvi, což ohrožuje reakci imunitního systému na přítomnost patogenů. Naopak parodontální vazivové buňky starších lidí vykazují při bakteriální stimulaci vyšší produkce zánětlivých mediátorů (L-1 ( $\beta$ ), IL-6 či prostaglandin E2), podílejících se na degradaci extracelulární matrix a na resorpci alveolární kosti (Huttner a kol. 2009).

Ačkoliv je parodontální onemocnění spojováno s vyšším věkem a samotné stárnutí je zodpovědné za určitou ztrátu parodontálních tkání a alveolární kosti, není závažná parodontitida přirozeným důsledkem stárnutí. Účinky stárnutí na parodontální tkáně však

mohou zhoršit regenerační schopnost tkání a kostní ztrátu u pacientů s parodontitidou (Huttner a kol. 2009).

Při posuzování jednotlivce náchylného k rychlé progresi onemocnění je věk důležitým faktorem. Úroveň destrukce tkáně ve vztahu k věku pacienta je dobrým ukazatelem budoucí progresi onemocnění. U mladého pacienta s agresivní formou parodontitidy a pokročilou ztrátou parodontálních tkání hrozí vyšší riziko horší a rychlejší progresi onemocnění a ztráty chrupu, než u staršího pacienta s chronickou parodontitidou a stejným stádiem poškození tkání (Heitz-Mayfield 2005).

#### **2.1.2.3.10 Pohlaví**

U mužů všech věkových kategorií, ras/etnických skupin a zeměpisných lokalit byla zjištěna vyšší prevalence parodontitidy a vyšší závažnost destrukce parodontu, než u žen. Spíše než s genetikou to souvisí s méně pozitivním postojem k orálnímu zdraví, horší ústní hygienou a s postoji k návštěvám zubních lékařů (Albandar 2005, Genco a Borgnakke 2013). Existují i jisté dočasné syndromy související s hormonálními stavy, jako je gingivitida spojená s těhotenstvím či gingivitida v pubertě, která však může postihnout děti obou pohlaví (Albandar 2005).

#### **2.1.2.3.11 Etnická příslušnost**

Prevalence a závažnost se u některých etnických/rasových skupin liší. Lidé afrického a latinskoamerického původu vykazují vyšší prevalenci parodontitidy a výraznější poškození parodontálních tkání než například běloši (Albandar 2002). Tento fakt může být částečně připisován socioekonomickým, behaviorálním a jiným rozdílům. Na druhé straně existují důkazy, že zvýšené riziko může být částečně spojené s biologickou/genetickou predispozicí (Albandar 2002, Hatem 2012).

#### **2.1.2.3.12 Výživa**

Přestože vliv výživy na parodontitidu není definován tak dobře, jako například vliv kouření či diabetes mellitus, je zřejmé, že i charakter stavy a její složení ovlivňuje parodontální zdraví. Nedostatek důležitých živin, může pacienta predisponovat k rychlejší progresi již existující parodontitidy a také ovlivňovat výsledek léčby (Neiva a kol. 2003, Ritchie a Kinane 2003, Najeeb a kol. 2016).

Největší pozornost je věnována vitamínům, které jsou nezbytné pro řadu klíčových metabolických procesů v lidském těle, včetně parodontálních tkání. Vitamíny A, C a E mimo jiné působí jako antioxidanty. Tyto antioxidanty pomáhají chránit tkáň proti působení tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS<sup>1</sup>, Reactive Oxygen Species), které jsou vylučovány z polymorfonukleárních leukocytů v reakci na přítomnost bakterií (Ritchie a Kinane 2003, Najeeb a kol. 2016). Vitamín C je navíc nezbytný pro tvorbu kolagenu a mezibuněčného materiálu a zlepšuje také odolnost vůči infekci. Při nedostatku těchto vitamínů mohou být výše uvedené funkce ohroženy/omezeny. Nedostatky vitamínů skupiny B mohou ovlivnit metabolismus bílkovin, sacharidů a tuků a snížit odolnost vůči infekci v důsledku narušené tvorby protilátek a některých funkcí neutrofilů (Neiva a kol. 2003). Řada vitamínů (zejména vitamíny skupiny B a vitamín C) se podílejí na procesu hojení ran a regenerace, při jejich nedostatku se tedy může zhoršit průběh léčby a doba hojení. (Neiva a kol. 2003, Najeeb a kol. 2016).

Negativní dopad může mít i nedostatek minerálů a stopových prvků. Nebezpečný může být zejména nedostatek vápníku, který je nutný pro udržování a tvorbu kalcifikovaných tkání jako jsou kosti a zuby. Funkce vápníku je závislá na vitamínu D, který zajišťuje jeho vstřebávání ve střevě (Najeeb a kol. 2016). Nedostatek vápníku vede (zejména u žen po menopauze) k zvýšenému riziku osteoporózy a tím i parodontitidy (Genco a Borgnakke 2013). Dále například nedostatek železa vede kromě anémie také k snížení aktivity antioxidantních enzymů a tím ke zvýšení oxidačního stresu a zhoršení parodontitidy. Nedostatkem fluoru mohou být ovlivněny i jeho funkce, jako je posílení zubní skloviny a zubního cementu. Fluor má navíc antibakteriální účinky-inhibuje růst a adhezi bakterií (Najeeb a kol. 2016).

Pokud jde o speciální stravovací návyky, De Filippis a kol. (2014) zkoumali bakteriální složení slin u populace s běžnými stravovacími návyky, ovo-lakto-vegetariánů a veganů, a dospěli k názoru, že tyto stravovací návyky nijak zásadně neovlivňují složení orálního mikrobiomu. U veganů hrozí vlivem stravovacích návyků určité riziko nedostatku B12 (Hujoel a Lingström 2017), což může mít teoreticky vliv na parodontální zdraví, neboť studie Zong a kol. (2016) zjistila, že nízké sérové hladiny vitamínu B12 byly spojeny se zhoršením parodontálního stavu zubů a jejich zvýšenou ztrátou.

---

<sup>1</sup> ROS ničí patogeny během fagocytózy. Kromě toho, že jsou vylučovány do fagozomu, dostávají se také do extracelulárního prostředí, kde přispívají k destrukci tkáně a stimulují produkci prozánětlivých cytokinů.

#### **2.1.2.4 Parodontitida jako rizikový faktor pro další nemoci**

Stejně tak, jako některé nemoci mohou zvyšovat riziko vzniku parodontitidy, může parodontitida ovlivňovat vznik a vývoj dalších onemocnění.

Lidem trpícím parodontitidou hrozí vyšší riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění než těm, kteří jsou parodontálně zdraví (Hatem 2012). Zánět vyvolaný parodontitidou může fungovat jako brána pro ústní bakterie (nejčastěji viridující streptokoky), které se tak dostávají do krevního řečiště a do srdce, což vede ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění jako je ateroskleróza nebo infekční endokarditida (Dhotre a kol. 2017).

Mezi onemocněním diabetes mellitus a parodontitidou funguje obousměrný vztah. Dlouhodobá přítomnost bakterií a tedy i dlouhodobě trvající zánět je příčinou toho, že jsou ve velkém množství vyplavovány prozánětlivé mediátory imunitního systému (IL-1, IL-6, IL 12, IL-18, TNF- $\alpha$  a další). Řada z těchto látek se dostává do krevního oběhu a přispívá ke vzniku systémového zánětu. Mediátory zánětu spouštějí kaskádu dějů, které ovlivňují lipidový a glukózový metabolismus, mohou způsobit poškození  $\beta$  buněk pankreatu a indukují inzulinovou rezistenci (Mealey a Oates 2006, Engebretson a kol, 2007). Diabetici s těžkou formou parodontitidy jsou náchylnější ke vzniku a rozvoji diabetických komplikací jako jsou retinopatie, nefropatie, neuropatie a kardiovaskulární onemocnění (Saremi a kol. 2005).

Parodontitida představuje zvýšené riziko také pro předčasný porod a porod dětí s nízkou porodní hmotností (Hatem 2012). Jedním z důvodů může být to, že dásně je vlivem hormonů (estrogen, pohlavní steroidy) během těhotenství více permeabilní a umožňuje tak zvýšené riziko proniknutí parodontálních patogenů do krevního řečiště a poté i do placenty. Tato teorie je podpořena studiemi, u nichž byly parodontální patogeny nalezeny v plodové vodě a u novorozenců. Dalším důvodem může být cytokiny indukovaná zvýšená produkce prostaglandinu (zejména prostaglandinu E2), hormonu, který mimo jiné stimuluje činnost dělohy (Clothier a kol. 2007).



### 2.1.2.5 Formy parodontitidy

Klasifikace parodontitidy je poměrně problematická a v závislosti na tom, jak se vyvíjely naše znalosti o ní, se v průběhu let několikrát změnila. V současné době se používá klasifikace, která byla ustanovena roku 1999 na Mezinárodním semináři pro klasifikaci parodontálních onemocnění a stavů (Armitage 1999). Podle této klasifikace rozlišujeme chronickou a agresivní parodontitidu. Ačkoliv jsou si obě formy v mnoha ohledech podobné, mají řadu významných klinických rozdílů zahrnujících:

- věk nástupu (detekce)
- míru progresu
- vzorec ničení
- klinické projevy zánětu
- relativní výskyt zubního plaku a zubního kamene.
- frekvence výskytu

Parodontitida může postihnout jeden nebo jen několik zubů, ale stejně tak může ovlivnit celý chrup. Pokud je postiženo méně než 30 % míst/zubů je onemocnění považované za **lokalizované**. Pokud je postiženo více než 30 %, je tato forma označována za **generalizovanou** (Nath a Raveendran 2011).

#### 2.1.2.5.1 *Chronická parodontitida*

Chronická parodontitida se nejčastěji vyskytuje u dospělých, ale občas může být pozorována i u dospívajících, zcela výjimečně u dětí. K posouzení rychlosti progresu je potřeba předchozí vyšetření a /nebo RTG snímek, což však často není k dispozici. Rychlost progresu je tedy většinou posouzena na základě věku pacienta a míry poškození v tomto věku (Slezák 1995, Van der Velden 2017). Ztráta tkání parodontu je ve většině případů relativně pomalá a ke ztrátě chrupu může dojít až v řádu několika let. Prognóza onemocnění je při včasné diagnóze a adekvátní terapii dobrá, relativně často choroba stagnuje i bez řádné terapie (Slezák 1995). Přítomnost subgingiválního zubního kamene je poměrně častým nálezem. Tato forma může být spojena s místními predispozičními faktory (anatomické odchylky chrupu, iatrogenní faktory), se systémovými nemocemi (Diabetes mellitus, HIV) a dalšími rizikovými faktory (kouření, emoční stres). Chronická parodontitida je uznávána jako nejčastěji se

vyskytující forma tohoto onemocnění a její prevalence a závažnost se zvyšuje s věkem (Highfield 2009, Nath a Raveendran 2011).

#### **2.1.2.5.2     *Agresivní parodontitida***

Agresivní parodontitida je vzácnější forma tohoto onemocnění, avšak mnohem závažnější. Vyskytuje se častěji u mladších jedinců, kteří bývají jinak zdraví. Zatímco generalizovaná forma nejčastěji postihuje mladší dospělé (většinou do 30 let) lokalizovaná agresivní parodontitida mívá začátek dokonce již v období puberty. Pro agresivní parodontitidu je charakteristická rychlá progresse onemocnění, rychlá ztráta chrupu a také sklon k recidivám. Prognóza choroby závisí na včasnosti diagnózy a adekvátní terapii, předčasným ztrátám chrupu se však někdy nelze vyhnout. (Slezák 1995) U této formy je sledován určitý rodinný výskyt. Bývá pozorován nesoulad mezi množstvím mikrobiálních usazenin a závažností destrukce parodontálních tkání, zubní kámen je nalézán v malém množství nebo vůbec. Toto platí zejména pro lokalizovanou agresivní formu, u které bývá pozorována také nižší úroveň zánětu dásní oproti ostatním formám (Highfield 2009, Nath a Raveendran 2011).

Rizikové faktory jako je stres, kouření, některé léky mohou negativně ovlivnit i agresivní parodontitidu. Obecně však platí, že genetické faktory hrají roli zejména ve vývoji parodontitidy u mladých jedinců, zatímco faktory související s životním stylem se stávají důležitějším v pozdějším životě (Van der Velden 2017).

Mikroskopický obraz tkání získaných z míst postižených chronickou či agresivní parodontitidou se nijak významně neliší. Co se týká imunologie, mezi těmito formami se vyskytují jen mírné rozdíly, které nenaznačují odlišnou imunopatologii. Podobné imunohistologické profily tedy naznačují podobné patologické mechanismy. Existují ale rozdíly v rychlosti, se kterou dochází k úbytku kostní tkáně, důvody pro to však nejsou stále jasné (Armitage a kol. 2010). Rozdílům v mikrobiologii se podrobněji věnuje kapitola 1.2.4.1..

### 2.1.2.6 Léčba parodontitidy

Léčba parodontitidy spočívá v co nejefektivnějším odstranění supragingiválního i subgingiválního biofilmu. Je důležité si uvědomit, že parodontitida je proces nevratný a poškozená kost již znovu nenaroste. Cílem léčby je tedy zastavení destrukce tkání a resorpce kosti. Úspěch terapie závisí na včasné diagnóze (s přibývajícím hloubkou chobotu klesá pravděpodobnost úspěchu), vhodné léčbě a také na spolupráci pacienta.

Na prvním místě je vždy mechanická léčba. Metodu zvanou SRP (scaling and root planing) provádí zubní lékař či dentální hygienistka a je prováděna v lokální anestezii. Ještě před touto metodou je nutná extrakce zubů, které již nelze zachránit, eliminace všech dalších faktorů, které by mohly mechanicky poškozovat dásně (korunky, výplně...), ošetření zubních kazů a odstranění supragingiválního plaku. SRP vede k odstranění obsahu parodontálního chobotu a k ošetření povrchu kořene zubu odstraněním svrchní vrstvy intoxikovaného cementu, popř. i dentinu (scaling). Následuje jemné mechanické vyhlazení očištěného povrchu kořene (root planing). Hladký povrch znesnadňuje bakteriím znovu rychle přilnout k ošetřenému zubu. K SRP se používají jak různé ruční nástroje (kyrety), tak nástroje aktivované ultrazvukem. Rozdíl v účinnosti mezi ručními a ultrazvukovým nástroji není nijak zásadní, pro nejefektivnější vyčistění se doporučuje použít jejich kombinaci (Slezák 1995, Tunkel a kol 2002).

V některých případech se doporučuje podpůrná antibiotická terapie. Antibiotika se mohou podávat lokálně nebo systémově. Lokální antibiotika bývají ve formě ústní vody, zubní pasty či gelu. Výhodou lokální aplikace je nižší dávka antibiotika aplikovaná v místě potřeby. Lokálně se nejčastěji používá chlorhexidin, který působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie. Je však nechvalně znám pro své vedlejší účinky jako je reverzibilní pigmentace jazyka, tkání, zubů a ovlivnění chuti. Výhodou systémově podávaných antibiotik je dlouhodobá a dostatečná koncentrace antibiotik v tkáních a tělních tekutinách a působení antibiotik i na rezervoár, nevýhodou jsou však vyšší dávky podávaného antibiotika a možnost vedlejších účinků. Systémově se používá například kombinace amoxicillinu a metronidazolu. Systémová antibiotika se používají zejména u pacientů s agresivní parodontitidou a těžkou chronickou parodontitidou. Je důležité zdůraznit, že samotnou antibiotickou léčbou bez mechanického odstranění biofilmu nelze dosáhnout kýženého výsledku (Mutschelknauss a kol. 2002, Stein a Jervøe-Storm 2011).

V případě neúspěchu výše uvedené léčby bývá nutné přistoupit k chirurgické léčbě. Indikací jsou perzistující parodontální choboty o hloubce větší než 6 mm. Rozhodování závisí také na počtu a lokalizaci těchto chobotů. Moderní chirurgické postupy umožňují nahradit poškozené tkáň závěsného aparátu pomocí řízené tkáňové regenerace, kdy se odstraní všechna postižená tkáň, očistí se povrch kořene zubu a čistý chobot se vyplní vhodným materiálem (Stein a Jervøe-Storm 2011).

Léčba parodontitidy je nákladná, dlouhodobá a vyžaduje vytrvalou a pečlivou domácí péči. Důležitá je motivace pacienta a jeho řádné poučení o správné péči o chrup. I přes veškerou snahu nelze stav parodontu vždy vrátit do původního stavu, kostní ztráta je nevratná, a jestliže onemocnění dosáhne určitého bodu, můžeme pozorovat trvalé následky i u gingiválních tkání (např. odhalené krčky).

### **2.1.2.7 Prevence parodontitidy**

Mezi hlavní preventivní opatření patří pravidelná dentální hygiena. Důležitá je správná technika čištění zubů a také používání mezizubních kartáčků, popř. zubní nitě. K vyčištění špatně dostupných míst může sloužit jednosvazkový tzv. solo kartáček. Vhodné jsou i výplachy ústní vodou. Důležité jsou také pravidelné návštěvy zubního lékaře a dentální hygienistky, kteří mohou včas odhalit vznikající problém a zastavit progresi vznikajícího onemocnění. Jako u většiny dalších onemocnění i zde lze doporučit zdravý životní styl, tedy pestrou a vyváženou stravu a vyvarování se rizikovým faktorům jako je kouření.

## **2.2 Bakterie**

Na základě tradičních kultivačních studií a moderních molekulárních metod bylo identifikováno více než 700 bakteriálních druhů pocházejících z dutiny ústní. (Paster a kol. 2006). Rozmanitost a četnost těchto druhů se může mezi jedinci značně lišit a závisí na celé řadě faktorů, jako je zdravotní stav, úroveň ústní hygieny či například věk. U každého jedince se vyskytují desítky až stovky těchto druhů. Určitou mikrobiální rozmanitost můžeme také pozorovat jednak v čase a jednak mezi různými místy stejného jedince (Paster a kol. 2006, Jorth a kol. 2014) Jazyk, zuby, sliznice, patro nebo dásněň mohou vykazovat do určité míry rozdílné bakteriální osídlení a četnost určitých druhů. Jisté rozdíly mohou být i mezi linguálním a vestibulárním povrchem stejného zubu. Tato rozmanitost je dána různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi na různých místech, která se mohou lišit mimo jiné hodnotou pH, množstvím kyslíku, teplotou či redoxním potenciálem. (Simón-Soro a kol. 2013)

### 2.2.1 Tvorba zubního plaku

Tvorba zubního plaku se vyznačuje určitou posloupností. Prakticky ihned po vyčištění zubů se na jejich povrchu začne tvořit tenká vrstva, tzv. pelikula. Hlavními složkami této vrstvy jsou proteiny a glykoproteiny, které pocházejí převážně ze slin. Vytvoření pelikuly mění povrchové vlastnosti zubu a umožňuje adhezi bakterií. Bakterie jsou nejprve k pelikule přitahovány fyzikálně-chemickými interakcemi a až poté dochází ke specifické adhezi. Tuto adhezi umožňují reakce mezi bakteriálními adheziny a receptory obsaženými v pelikule. Mezi počáteční kolonizátory patří grampozitivní fakultativně anaerobní bakterie, zejména orální streptokoky (zvláště *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* a dále *Streptococcus sanguinis* a *Streptococcus gordonii*) a následně aktinomycety (například *Actinomyces naeslundii*). Streptokoky jsou méně citlivé na přítomnost kyslíku než většina ústních bakterií, podílejí se na změně prostředí a tvoří tak základ pro další vývoj biofilmu (Kolenbrander a kol. 2006, Kriebel a kol. 2018). K tomuto základu se postupně připojují další a další bakterie rodů *Gemella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Rothia*, *Veillonella*, *Haemophilus*, *Aggregatibacter* aj. (Diaz a kol. 2006, Kolenbrander a kol. 2006). Řada bakterií nemá schopnost vzájemné koagregace, a proto jsou pro tvorbu a zrání ústního biofilmu velmi důležité bakterie rodu *Fusobacterium*, zejména *Fusobacterium nucleatum*. Tyto tenké, dlouhé tyčky nesou na svém povrchu řadu adhezínů, které jsou rozpoznávány receptory jak časných, tak pozdních kolonizátorů a fusobakterie tak tvoří jakýsi „most“ mezi těmito bakteriemi (Kolenbrander a kol. 2006). Podobnou funkci mají pravděpodobně také bakterie rodu *Corynebacterium*, zejména *Corynebacterium matruchotii* (Kriebel a kol. 2018). Mezi pozdější kolonizátory patří například rody *Prevotella*, *Campylobacter*, *Treponema*, *Porphyromonas* či *Tannerella* (Kolenbrander a kol. 2006). Důležitou úlohu v biofilmu mají pravděpodobně také bakterie rodu *Fretibacterium*. Tyto bakterie tvoří palisádovou linii ve vrchní vrstvě biofilmu, kde jsou v těsném kontaktu s buňkami imunitního systému, což naznačuje jejich možnou úlohu při interakcích mezi hostitelem a biofilmem (Zijngel a kol. 2010).

Pokud je zubní plak ponechán nerušen jeho množství se stále zvětšuje, počet bakteriálních druhů narůstá a supragingivální plak se rozšiřuje do dásňového žlábků. U vzniklého subgingiválního plaku pak můžeme pozorovat mnohem vyšší druhovou rozmanitost oproti plaku supragingiválnímu (Kolenbrander a kol. 2006). Postupně, jak se zubní plak vytváří, dochází k přechodu od grampozitivních fakultativně anaerobních druhů (zejména koky) k převažujícím gramnegativním anaerobním bakteriím (tyčinky, vláknité bakterie, spirochéty). Tento posun v mikrobiální kompozici má velký význam, neboť koreluje

s výskytem zánětu dásní a posléze parodontitidy. Byl znám již v minulosti a použití současných moderních molekulárních metod ho potvrzuje (Socransky a kol. 1998, Kolenbrander a kol. 2006, Kriebel a kol. 2018).

### **2.2.2 Vlastnosti bakteriálního biofilmu**

Vývoj biofilmu je umožněn díky mnoha bakteriálním interakcím, které lze v zubním plaku pozorovat, a díky kterým je možný výskyt i těch bakterií, které by v daném prostředí jinak nepřežily. Nárůst anaerobních bakterií je dán jednak tím, že množení bakterií a produkce extracelulární matrix zvyšuje výšku biofilmu a tedy znesnadňuje průnik kyslíku, ale také tím, že bakterie, které spotřebovávají kyslík, vytvářejí vhodné prostředí pro růst striktních anaerobů (Kolenbrander a kol. 2006). V zubním plaku můžeme pozorovat i různé nutriční interakce. Primární živiny pro tyto bakterie jsou hostitelské proteiny a glykoproteiny, které jsou u supragingiválního plaku získávány hlavně ze slin a u subgingiválního plaku ze sulkulární tekutiny. Pro katabolismus těchto strukturně složitých substrátů (zejména glykoproteinů) je nutný koordinační účinek několika bakteriálních druhů a jejich enzymů. Další nutriční interakcí může být vztah, kdy se produkt metabolismu jedné bakterie stává zdrojem živin pro další bakterii. Interakce mezi bakteriemi však nemusí být pouze synergická, ale může být naopak i antagonická, kdy bakterie produkují různé látky (například bakteriociny), které jsou namířené proti „konkurenčním“ bakteriím. Antagonické reakce mohou být i prospěšné, protože mohou zabraňovat exogenním druhům kolonizovat ústní dutinu. Blízkost bakterií v biofilmu poskytuje také ideální podmínky pro horizontální přenos genů. Získané geny mohou zvyšovat adaptační potenciál ke změnám v orálním prostředí, mohou zvyšovat bakteriální rezistenci vůči antibiotikům a také ovlivňovat virulenci bakterií. (Marsh a Zaura 2017) Některé bakterie jsou navíc schopné ovlivňovat expresi genů okolních bakterií a ovlivnit tak jejich virulenci a růst. Bakterie v biofilmu tedy mohou vykazovat jiné vlastnosti, než pokud rostou samostatně (Kolenbrander a kol. 2006) a chovají se spíše jako integrované komunity, než jako nezávislé subjekty (Teles a kol. 2013). Jedním z významných rozdílů mezi biofilmem a planktonickým modelem je velmi vysoká tolerance biofilmů vůči antimikrobiálním látkám a vůči imunitním mechanismům hostitele. Tato tolerance je dána mimo jiné omezením propustnosti těchto látek do biofilmu, jejich zachycením a komunitní degradací či nadměrnou expresí genů rezistence (Teles a kol. 2013).

### 2.2.3 Dysbióza

Kolonizace ústní dutiny parodontálně zdravých jedinců je založena na vyvážených interakcích mezi bakteriemi a hostitelem a mezi bakteriemi navzájem. Ačkoliv jsou tyto interakce dynamické, jako celek je tento systém v určité stabilní rovnováze a bez známek zánětu. Tato rovnováha poskytuje ochranu proti menším ekologickým poruchám a přispívá tak k orálnímu zdraví (Socransky a Haffajee 2005, Kriebel a kol. 2018). Pokud trvalá akumulace plaku a některé klíčové environmentální faktory překročí určitou hranici (která může být u každého jedince individuální), může dojít narušení této rovnováhy. Následkem je reakce imunitního systému, změna prostředí a změna ve složení biofilmu (Socransky a Haffajee 2005, Marsh a Zaura 2017). Hostitel tedy může ovlivnit mikroflóru a naopak mikroflóra může ovlivnit hostitele, a to jak na lokální, tak na systémové úrovni. Bakteriální kolonizace, která vyvolává lokální zánětlivou odpověď, je touto odpovědí následně dále ovlivněna. (Socransky a Haffajee 2005) Zánětlivá reakce je provázena zvýšeným průtokem sulkulární tekutiny, ale také malým zvýšením pH a teploty. Sulkulární tekutina přináší nejen molekuly sloužící k obraně proti bakteriím (imunoglobuliny, složky komplementu, cytokiny, neutrofilny), ale může také sloužit jako substrát pro proteolytické bakterie. Zatímco citlivé bakteriální druhy mohou být imunitním systémem eliminovány (i když některé mohou přežít díky ochraně sousedních odolných druhů), bakterie schopné tolerovat nebo dokonce využívat zánětlivé prostředí vzkvétají (zejména parodontální patogeny). Tyto změny prostředí tedy ovlivňují konkurenceschopnost bakterií a jejich vzájemné interakce a vedou ke změnám ve složení biofilmu a k dysbióze mezi orálním mikrobiomem a hostitelem. (Marsh a Zaura 2017). Dysbióza může být definována jako: „definitivní změna mikroflóry v daném místě, která je doprovázena narušením hostitelsko-mikrobiálního vzájemného vztahu“. Typickým rysem dysbiózy je preferenční ztráta mikroorganismů, které jsou v souladu s lidským zdravím (na daném místě) a odpovídající nárůst patogenů, kteří jsou členy komenzální mikroflóry s potenciálem vyvolat patologii. (Mira a kol. 2017) Postupně tedy dochází k nárůstu bakterií spojených s parodontitidou a k úbytku (případně až úplnému zmizení) bakterií spojených s parodontálním zdravím (Kirst a kol. 2015, Mira a kol. 2017). Tato teorie je mírně v rozporu s názorem Abusleme a kol. (2013), který naznačil, že: „posuny ve struktuře společenství z parodontálního zdraví k parodontitidě se podobají ekologické sukcesi s nástupem nově dominantních taxonů v parodontitidě, aniž by došlo k nahrazení primárních druhů spojených s parodontálním zdravím“.

Griffen a kol. (2012) naznačil, že změna složení orálního mikrobiomu ve prospěch zvýšeného výskytu parodontálních patogenů pravděpodobně předchází prvním klinickým projevům parodontálního onemocnění. To by znamenalo, že jejich nález by mohl sloužit jako prognóza pro možný nástup onemocnění.

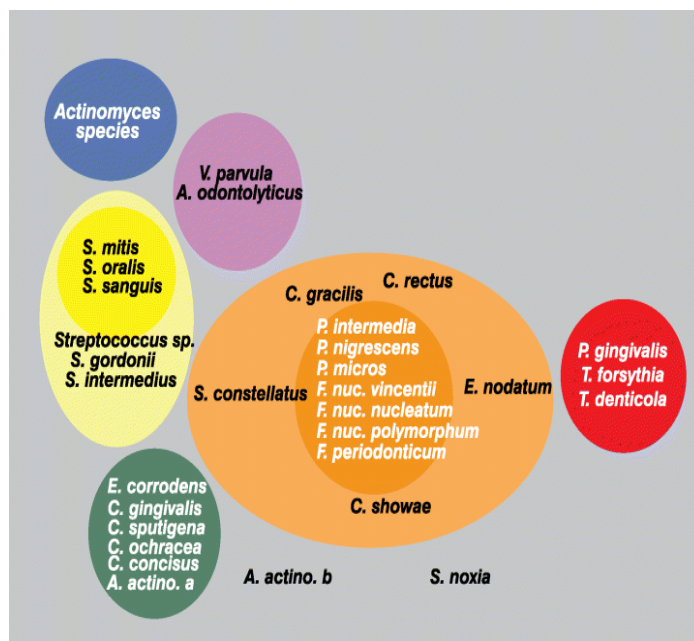
#### **2.2.4 Orální mikrobiom spojený s parodontálním zdravím a s parodontitidou**

Desítky let výzkumů již prokázaly, že složení orálního mikrobiomu se liší u pacientů s parodontitidou a u parodontálně zdravých jedinců. Zatímco orální mikrobiom ve zdraví je taxonomicky chudší, u parodontitidy můžeme pozorovat mnohem pestřejší druhové složení a rozmanitost a také větší množství biomasy (Socransky a kol. 1998, Griffen a kol. 2012, Abusleme a kol. 2013, Szafranski a kol. 2015). Příčinou jsou výše uvedené změny prostředí způsobené zánětem. Dalším důvodem může být také fakt, že vznikající parodontální chobot poskytuje nová stanoviště a podmínky, které umožní kolonizaci dalších druhů (Socransky a Haffajee 2005, Griffen a kol. 2012).

V roce 1998 Socransky a kol. definovali 5 skupin bakterií, tzv. komplexů, které se liší svým vztahem k parodontálnímu zdraví/ nemoci (obrázek 3). Příslušnost ke konkrétnímu komplexu byla definována na základě častého výskytu právě společně s dalšími taxony daného komplexu. Tato společná asociace byla interpretována jako existence konsorcií bakteriálních druhů působících společně, vzájemně prospěšným způsobem. Komplex nejsilněji spojený s parodontitidou, červený komplex, je složen ze tří bakteriálních druhů, a to *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *T. denticola*. Oranžový komplex se skládá z *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus constellatus* a z několika poddruhů *F. nucleatum*. Zelený komplex zahrnuje *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* a *A. actinomycetemcomitans* sérotyp a. Skupina streptokoků *Streptococcus intermedius*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. mitis* a *S. oralis* tvoří žlutý komplex a *Veillonella parvula* a *Actinomyces odontolyticus* tvoří komplex fialový. Tyto dva poslední komplexy jsou spojovány s parodontálním zdravím. *A. actinomycetemcomitans* sérotyp b, *Selenomonas noxia* a *A. naeslundii* nebyly na základě získaných dat přiřazeny k žádnému z uvedených komplexů. Nejen bakterie uvnitř komplexů, ale i komplexy samotné vykazují vzájemně specifické vztahy. Červený komplex je úzce spojen s oranžovým. Bakterie červeného komplexu jsou jen zřídka nalezeny za nepřítomnosti bakterií oranžového komplexu. Navíc, jejich množství se



zvyšuje s narůstající kolonizací oranžového komplexu. Údaje tedy naznačují, že druhy oranžového komplexu předcházejí kolonizaci červeného. Tyto dva komplexy jsou zároveň odděleny od žlutého a zeleného. Pozorované vztahy do jisté míry napodobují vzor ekologické sukcese při vývoji zubního plaku. *A. naeslundii* a streptokoky žlutého komplexu jsou časní kolonizátoři následovaní druhy fialového a zeleného komplexu. Poté dochází ke kolonizaci bakteriemi oranžového komplexu a nakonec v některých místech i červeného. Červený komplex koreluje s hloubkou parodontálního chobotu- čím je hlubší, tím stoupá prevalence těchto druhů. Je také silně spojen s krvácením při sondování. Podobné vlastnosti lze pozorovat i u bakterií oranžového komplexu, avšak v menší míře. (Socransky a kol. 1998) Tato studie znamenala zásadní průlom v chápání složení orálního mikrobiomu při parodontálním zdraví a parodontitidě, zejména díky zjištění, že parodontitida není způsobena působením jediné patogenní bakterie (jak tomu bývá u klasických infekčních chorob), ale je výsledkem spolupráce celé řady bakterií.



**Obrázek 3 Bakteriální komplexy podle Socransky a kol. 1998**

Červený a oranžový komplex jsou nejvíce asociované s parodontitidou, žlutý a fialový naopak s parodontálním zdravím. Modře jsou vyznačeny druhy *Actinomyces*, které netvoří komplex jako takový.

Od této průkopnické studie byla publikována celá řada prací, které se zaměřily na charakterizaci orálního mikrobiomu jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s parodontitidou. Nicméně tyto studie se mohou lišit v mnoha důležitých faktorech jako je například věk osob, etnická skupina, kuřáci/ nekuřáci či zdravotní stav (diabetici, HIV pozitivní apod.). Liší se také kritéria, na základě kterých bylo definováno parodontální zdraví a parodontitida u testovaných osob (různá rozhodná hloubka parodontálních chobotů, počet postižených zubů atd.) Různé jsou i použité diagnostické metody a v neposlední řadě také parametry, pomocí kterých byly bakterie přiřazeny k jednomu či druhému stavu. Vzhledem k těmto faktorům je tedy obtížné jednoznačně přiřadit dané bakterie k parodontálnímu zdraví či naopak parodontitidě. Označení bakterií za parodontální patogeny je založeno především na jejich vysoké prevalenci v místech postižených parodontitidou a naopak na jejich nepřítomnosti nebo výrazně redukovaném výskytu u parodontálně zdravých osob. Díky rychlému rozvoji molekulárních metod (zejména těch sekvenačních) vzniká zdánlivě nekonečně rostoucí seznam těchto patogenů, nicméně důležitost některých druhů jako etiologických činitelů parodontitidy zůstává diskutabilní a funkce řady bakterií při rozvoji parodontitidy je neznámá.

Následující tabulky 1-9 přehledně shrnují dostupné literární údaje ze čtyř studií, ve kterých se, v každé jiným způsobem, autoři pokusili o přiřazení konkrétních orálních taxonů k parodontálnímu zdraví či nemoci (Griffen a kol. 2012, Abusleme a kol. 2013, Szafranski a kol. 2015, Kirst a kol. 2015). Tyto studie využívaly pro stanovení taxonomické kompozice orálního mikrobiomu metody paralelního sekvenování (454 pyrosekvenování a Illumina) úseků 16S rDNA. Na základě porovnání abundance konkrétních taxonů ve zdraví a nemoci pak autoři definovali bakterie asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou. Taxony, které ještě nebyly kultivovány nebo pojmenovány jsou uvedeny pod jejich HOT (Human Oral Taxon, viz dále) číslem. Tabulky jsou uspořádány podle bakteriálních kmenů a vztahují se k chronické formě parodontitidy.

Mezi nejrozšířenější kmény v ústní dutině patří Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes a Fusobacteria tvořící 96% orálních taxonů (Dewhirst a kol. 2010), méně zastoupené kmény pak jsou Chloroflexi, a TM7 (Mira a kol. 2017). Zatímco kmény Spirochaetes, Synergistetes a Bacteroidetes jsou podle Griffen a kol. (2012) asociovány s parodontitidou, Proteobacteria (Griffen a kol. 2012) a Actinobacteria (Abusleme a kol. 2013) jsou spojovány spíše se zdravím. V rámci kmene Firmicutes je třída Bacilli asociována se zdravím a třídy Clostridia, Negativicutes a Erysipelotricchia s parodontitidou (Griffen a kol. 2012).

**Tabulka 1 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Proteobacteria**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998).  
Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh/HOT	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<i>Aggregatibacter</i> <sup>2</sup>		2		-
	<i>HOT 458</i>		2	
<i>Desulfobulbus</i>			2	-
	<i>HOT 041</i>		1, 2, 3, 4	
<i>Campylobacter</i>				-
	<i>rectus</i>		2	
<i>Moraxella</i>		2, 4		-
	<i>osloensis</i>	2		
<i>Acinetobacter</i>		2		-
	<i>junii</i>	2		
<i>Lautropia</i>		2		-
	<i>mirabilis</i>	2		
<i>Burkholderia</i>		2		-
	<i>cepacia</i>	1		
<i>Kingella</i>				-
	<i>oralis</i>	4		
<i>Haemophilus</i>		2, 4		-
	<i>parahaemolyticus</i>	2		
<i>Neisseria</i>				-
	<i>flavescens</i>	4		

<sup>2</sup> Dřívější název *Actinobacillus*

**Tabulka 2 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Actinobacteria**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998).

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<b>Actinomyces</b>		2		+
	<i>naeslundii</i>	1, 2, 3, 4		
	<i>oris</i>	4		
	<i>odontolyticus</i>	1		
	<i>gerencseriae</i>	1		
	<i>massiliensis</i>	2		
	<i>HOT 169</i>	3		
	<i>HOT 170</i>	1, 2, 3		
	<i>HOT 171</i>	3		
	<i>HOT 175</i>	3		
	<i>HOT 177</i>	1		
	<i>israelii</i>		4	
	<i>cardiffensis</i>		4	
<b>Rothia</b>		2		+
	<i>aeria</i>	2, 3		
	<i>dentacariosa</i>	1, 2, 3		
<b>Brachybacterium</b>		2		+
	<i>rhamnosum</i>	2		
<b>Corynebacterium</b>	<i>matruchotii</i>	3		+
	<i>durum</i>	3		
<b>Arthrobacter</b>		2		+
	<i>wuluwensis</i>	2		
<b>Bifidobacterium</b>				+
	<i>dentinum</i>		2	
<b>Atopobium</b>				+
	<i>rimae</i>		4	
<b>Slackia</b>				+
	<i>exigua</i>		4	
<b>Olsenella</b>			2	+
	<i>uli</i>		4	

**Tabulka 3 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Firmicutes (třídy Clostridia, Mollicutes, Erysipelotrichia, Negativicutes)**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998).

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní) V (variabilní) B (bez buněčné stěny)

Rod	Druh	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<i>Filifactor</i>			2	+
	<i>alocis</i>		1, 2, 3	
<i>Eubacterium</i>				+
	<i>nodatum</i>		1	
	<i>saphenum</i>		1, 2	
	<i>brachy</i>		1, 2	
	<i>minutum</i>		1	
	<i>yurii subsp</i>		2	
<i>Catonella</i>			2	-
	<i>morbi</i>			
<i>Parvimonas</i>				+
	<i>micra</i>		1	
<i>Pseudoramibacter</i>			2	+
	<i>alactolyticus</i>		1	
<i>Mogibacterium</i>			2	+
	<i>timidum</i>		1, 3, 4	
<i>Peptostreptococcus</i>			2	+
	<i>stomatitis</i>		1, 2	
	<i>HOT 113</i>		1	
	<i>HOT 091</i>		1	
	<i>HOT 369</i>		1	
<i>Johnsonella</i>			2	-
	<i>HOT 166</i>		1, 2	
<i>Stomatobaculum</i>			2	V
	<i>HOT 373</i>		1	
<i>Lachnospiraceae [G-8]</i>				+
	<i>HOT 500</i>		1, 2	
<i>Mycoplasma</i>			2	B
	<i>faucium</i>		1, 4	
	<i>salivarium</i>		4	
<i>Erysipelotrichaceae [G-1]</i>				+
	<i>HOT 905</i>		4	
<i>Selenomonas</i>			2	-
	<i>sputigena</i>		1, 2	
<i>Anaeroglobus</i>				-
	<i>geminatus</i>		2	
<i>Megasphaera</i>			2	-
<i>Veillonellaceae</i>			2	-
	<i>HOT 129</i>		2	
	<i>HOT 132</i>		1	
	<i>HOT 155</i>		1	
	<i>HOT 148</i>		4	
	<i>HOT 918</i>		4	
<i>Veillonella</i>				-
	<i>Parvula</i>	3		

**Tabulka 4 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Firmicutes (třída Bacilli)**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998)  
Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh/HOT	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<i>Streptococcus</i>		2		+
	<i>gordonii</i>	3		
	<i>mitis</i>	2, 3		
	<i>sanguis</i>	1, 2, 3		
	<i>constellatus</i>		1, 4	
	HOT 65	4		
<i>Gemella</i>		2		+
	<i>haemolysans</i>	3, 4		
	<i>morbilorum</i>	2		
<i>Granulicatella</i>		2		+
	<i>adiacens</i>	2, 3		

**Tabulka 5 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Fusobacterium**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998)  
Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh/HOT	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<i>Fusobacterium</i>			2	-
	<i>nucleatum ss. nucleatum</i>		4	
	<i>nucleatum ss. vincentii</i>		3	
	<i>nucleatum ss. polymorphum</i>	3		
	HOT 203		3	
<i>Leptotrichiaceae [G-1]</i>				-
	HOT 210		2	
<i>Leptotrichia</i>			2	-
	HOT 498		2	

**Tabulka 6 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene TM7 a Chloroflexi**

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh/HOT	Parodontální zdraví	Parodontitida	G +/-
<i>TM7</i>			2	+
	<i>HOT 437</i>		2	
	<i>HOT349</i>		1, 2	
	<i>HOT 346</i>		1	
	<i>HOT 356</i>		1	
	<i>HOT 401</i>		2	
	<i>HOT 347</i>	4		
<i>Chloroflexi</i>			2	-
	<i>G-1 HOT 439</i>		1, 4	

**Tabulka 7 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Synergistetes**

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh	Parodontální zdraví	Parodontitida	Gram
<i>Fretibacterium</i> <sup>3</sup>			2	-
	<i>Fastidiosum</i>		1, 3, 4	
	<i>HOT 360</i>		1, 2, 3, 4	
	<i>HOT 361</i>		1, 3	
	<i>HOT 362</i>		1	
	<i>HOT 453</i>		2, 4	

<sup>3</sup> Dřívější název *Synergistetes*

**Tabulka 8 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Spirochaetes**

Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998)

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh	Parodontální zdraví	Parodontitida	Gram
<i>Treponema</i>			2	-
	<i>denticola</i>		1, 2, 3	
	<i>lecithinolyticum</i>		1, 2, 3	
	<i>medium</i>		1, 2	
	<i>vincentii</i>		2	
	<i>maltophilum</i>		1	
	<i>socranskii</i>		3, 4	
	<i>parvum</i>		1	
	<i>amylovorum</i>		2	
	<i>HOT 230</i>		2	
	<i>HOT 237</i>		1, 3	
	<i>HOT 246</i>		2	
	<i>HOT 249</i>		1	
	<i>HOT 253</i>		1	
	<i>HOT 257</i>		1	
	<i>HOT 258</i>		1	



**Tabulka 9 Bakteriální taxony asociované s parodontálním zdravím a parodontitidou u kmene Bacteroidetes**

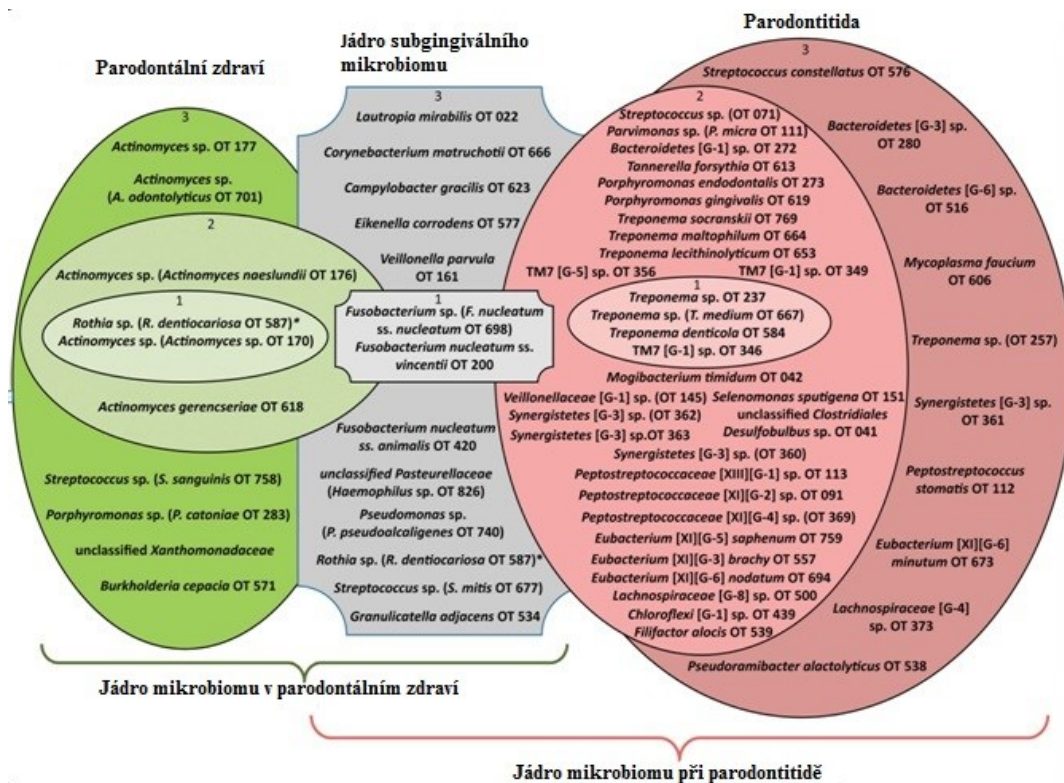
Barevné zvýraznění odpovídá barvám komplexů podle Socransky a kol. (1998)

Zdroje: 1 (Abusleme a kol. 2013), 2 (Griffen a kol. 2012), 3 (Kirst a kol. 2015), 4 (Szafranski a kol. 2015). G + (grampozitivní) G – (gramnegativní)

Rod	Druh	Parodontální zdraví	Parodontitida	Gram
<i>Tannerella</i>			2	-
	<i>forsythia</i> <sup>4</sup>		1, 2, 3	
<i>Porphyromonas</i>			2	-
	<i>gingivalis</i>		1, 2, 3, 4	
	<i>endodontalis</i>		1, 2, 3, 4	
	<i>catoniae</i>	1		
<i>Prevotella</i>			2	-
	<i>denticola</i>		2	
	<i>tannerae</i>		2	
	<i>oris</i>		4	
	<i>intermedia</i>		2, 3	
	<i>HOT 526</i>		2, 4	
<i>Bacteroidetes [G-1]</i>				-
	<i>HOT 272</i>		1, 4	
<i>Bacteroidetes [G-3]</i>				-
	<i>HOT 280</i>		1, 4	
<i>Bacteroidetes [G-6]</i>				-
	<i>HOT 516</i>		1	
<i>Bacteroidales [G-2]</i>				-
	<i>HOT 274</i>		2, 3	
<i>Capnocytophaga</i>				-
	<i>gingivalis</i>	3		

4 Dřívější názvy *Bacteroides forsythus* a *Tannerella forsythensis*.

Abusleme a kol. (2013) ve své studii rozdělil mikroorganismy identifikované v dutině ústní na ty typické pro parodontitidu (viz obr 4, červené tvary), typické pro parodontální zdraví (zelené tvary), a mikroorganismy, které se dle jeho výsledků vyskytovaly rovnoměrně jak u zdravých osob, tak u pacientů, označil jako „jádro mikrobiomu“ (šedé tvary). Předpokládal, že tyto mikroorganismy se vyskytují rovnoměrně v populaci nezávisle na parodontálním zdravím. Jádro subgingiválního mikrobiomu v oblasti parodontálního zdraví pak podle něj představují bakterie uvedené v zelených plus šedivých tvarech a jádro subgingiválního mikrobiomu při parodontitidě bakterie v šedých plus červených tvarech.



Obrázek 4 Rozdělení bakteriálních taxonů podle Abusleme a kol. 2013  
Převzato a upraveno podle Abusleme a kol. 2013

#### 2.2.4.1 Bakterie asociované s agresivní formou parodontitidy

Řada studií se zabývala také otázkou, zda se složení subgingiválního mikrobiomu liší u pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou. S agresivní parodontitidou byla v minulosti spojována zejména bakterie *A. actinomycetemcomitans*, která byla u těchto pacientů často nalézána. S vývojem nových molekulárních technik se však naše znalosti o složení orálního mikrobiomu velmi rozšířily a nyní se tato bakterie považuje za vedlejší složku rezidentní orální mikroflóry a za spíše příležitostného patogena. (Könönen a Müller 2014) S agresivní parodontitidou, zejména s její lokalizovanou formou, je však spojován specifický klon této bakterie označovaný jako JP2 (sérotyp b). U toho kmene je prokázána zvýšená aktivita leukotoxinu, který umožňuje bakteriím vyhnout se reakci hostitele zabitím leukocytů. (Brogan a kol. 1994, Könönen a Müller 2014) Další informace o bakteriích souvisejících s lokalizovanou agresivní parodontitidou jsou velmi omezené (Könönen a Müller 2014). Pokud jde o generalizované formy chronické a agresivní parodontitidy, tak ani zde nejsou výsledky zcela jasné. Řada studií, například Ximenez-Fyvie a kol. 2006 či Rescala a kol. 2010, nenalezla žádné významné rozdíly mezi těmito formami a některé studie našly jen určité zvýšení již známých parodontálních patogenů u generalizované agresivní parodontitidy. Příkladem je studie Faveri a kol. (2008), kde je popsána identifikace zvýšeného množství bakterií rodu *Selenomonas* (zejména *S. sputigena*) u generalizované agresivní parodontitidy ve srovnání s generalizovanou chronickou parodontitidou nebo podobně Riep a kol. (2009) pro *T. lecithinolyticum*. Könönen a Müller (2014) ve svém přehledovém článku shrnuli, že i přes širokou heterogenitu bakterií v subgingiválním plaku, jsou za potenciální patogeny generalizované agresivní parodontitidy považovány zejména bakterie oranžového a červeného komplexu, a že bakteriální nálezy se velmi podobají chronické parodontitidě, tedy představují směsnou polymikrobiální infekci. K podobnému názoru došel Van der Velden (2017), který uvedl, že: „Z přehledu literatury nevyplývaly žádné kvalitativní rozdíly mezi agresivní a chronickou parodontitidou týkající se bakteriálních aspektů“.

### 2.2.5 Faktory virulence

Faktory virulence jsou molekuly exprimované bakteriemi, které umožňují kolonizaci daného místa v hostiteli, napadení hostitelských buněk a ohrožení imunitní odpovědi (Li a kol. 2014).

Prvním nutným krokem při bakteriální kolonizaci je adheze bakterií k hostitelské tkáni. Bakterie vyvinuly na svých površích velmi rozmanité spektrum adhezivních molekul, které jim umožňují rozpoznání a vazbu na specifické receptory hostitelských buněk. Můžeme pozorovat různé typy fimbrií, pili či povrchových proteinů (Amano a kol. 2010). Dalším krokem je invaze do tkání, která přispívá k jejich rozpadu. Některé bakterie, jako například *P. gingivalis* či *T. forsythia* jsou schopny invaze do buněk. Tyto buňky pak slouží jako ochrana před imunitním systémem a také jako rezervoár těchto bakterií (Feng a Weinberg 2006).

Bakterie mohou poškozovat parodontální tkáň přímo i nepřímo. Přímé poškození může být způsobeno působením bakteriálních toxinů a hydrolytických či proteolytických enzymů, jako jsou různé kolagenázy, chondroitinázy či hyaluronidázy. Parodontální tkáň jsou bohaté na proteiny. Peptidy a aminokyseliny uvolněné jejich degradací slouží řadě bakterií jako zdroj energie a uhlíku. Stejně tak mohou jako zdroj energie a uhlíku sloužit peptidy a aminokyseliny uvolněné degradací proteinů, které se podílejí na zánětlivých reakcích (Eley a Cox 2003). Parodontální tkáň mohou být poškozeny také prostřednictvím konečných produktů bakteriálního metabolismu, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. kyselina máselná) nebo látky obsahující síru či amoniak. Kyselina máselná může například indukovat apoptózu epitelálních a imunitních buněk nebo ovlivňovat funkci a genovou expresi gingiválních fibroblastů a podporovat tak onemocnění (Jorth a kol. 2014, Li a kol. 2014).

Některé bakterie mohou stimulovat hostitelské zánětlivé kaskády, které zahrnují chemokiny, cytokiny, prostaglandiny a matrix metaloproteinázy, které podporují destrukci tkání nepřímo (Graves a kol. 2000). Zároveň jsou některé bakterie (například *P. gingivalis*) schopné určité složky imunitního systému inhibovat či jinak ovlivňovat ve svůj prospěch (How a kol. 2016). Vztah parodontálních bakterií a imunitního systému při rozvoji

parodontitidy představuje vysoce komplexní soubor vzájemných interakcí, z nichž jen malá část byla dosud zdokumentována a objasněna.

### **2.2.5.1 Bakterie červeného komplexu**

Bakterie červeného komplexu jsou nejvíce spojovány s parodontitidou (Socransky a kol. 1998). Tyto bakterie navíc vzájemně metabolicky spolupracují. *P. gingivalis*, například, produkuje kyselinu izomáselnou, čímž stimuluje růst *T. denticola*, zatímco kyselina jantarová produkovaná *T. denticola*, zlepšuje růst *P. gingivalis* (Grenier 1992). Dalším příkladem může být vztah *T. forsythia* a *P. gingivalis*, kdy *T. forsythia* produkuje sukcinát, prekurzor pro syntézu membránových lipidů a fosfolipidů, který podporuje růst *P. gingivalis*. Růst *P. gingivalis*, vysoce proteolytického organismu, pak vede k další destrukci hostitelských proteinů, uvolnění peptidů a aminokyselin, které poskytují živiny pro *T. forsythia* (Sharma 2010). Některé studie na zvířatech navíc naznačují, že polymikrobiální infekce těmito bakteriemi vykazují vyšší virulenci, než monoinfekce (Washizu a kol. 2003, Kesavalu a kol. 2007).

#### **2.2.5.1.1 *Porphyromonas gingivalis***

*P. gingivalis* je gramnegativní, striktně anaerobní, nepohyblivá a asacharolytická tyčka, která roste na krevním agaru v černě pigmentovaných koloniích, a je považována za klíčovou bakterii v etiologii parodontitidy. Tato bakterie produkuje celou řadu virulenních faktorů, které jí umožňují vstup do buněk hostitele a následnou destrukci parodontálních tkání jak přímo, tak nepřímo. (How a kol. 2016)

Jedním z těchto faktorů je pouzdro, které, mimo jiné umožňuje adhezi bakterií. Opouzdřené bakterie jsou virulentnější a odolnější vůči fagocytóze než ty bez pouzdra. Brunner a kol. (2010) navíc prokázal, že opouzdřená *P. gingivalis* je schopna modulovat imunitní odpověď hostitele snížením syntézy cytokinů IL-1, IL-6 a IL-8 fibroblasty a tím zvýšit svoji schopnost uniknout imunitnímu systému. Dalším faktorem důležitým pro adhezi jsou fimbrie. U *P. gingivalis* se vyskytují dva typy fimbrií, a to tzv. dlouhé (majoritní) a krátké (minoritní). Fimbrie *P. gingivalis* umožňují nejenom adhezi k širokému spektru orálních substrátů a molekul či bakterií, ale podílejí se také na invazi do hostitelských buněk. (Amano a kol. 2004) Lipopolysacharid je důležitý virulenní faktor mnoha parodontálních

bakterií, včetně *P. gingivalis*. Tato membránová komponenta gramnegativních bakterií je schopna ovlivňovat hostitelské zánětlivé reakce a narušit proces remodelace kostí. Lipopolysacharid *P. gingivalis* je špatně rozpoznávaný hostitelským imunitním systémem a narušuje distribuci leukocytů v blízkosti bakteriální kolonizace (Liu a kol. 2008). Navíc je schopen tzv. paralýzy chemokinu, tedy paralýzy vylučování IL-8 gingiválními epiteliálními buňkami a ovlivňuje tak aktivaci neutrofilů, bazofilů a eozinofilů (Darveau a kol. 1998). Absence účinné obranné imunity tak umožňuje další množení parodontálních bakterií (How a kol. 2016). *P. gingivalis* produkuje také řadu hydrolytických, proteolytických a lipolytických enzymů. Mezi nejvýznamnější enzymy patří proteázy známé jako gingipain R a gingipain K. Tyto proteázy degradují komponenty extracelulární matrix, fibrinogen, cytokiny, imunoglobuliny, složky komplementu či buněčné receptory a dále například aktivují hostitelské matrix metaloproteinázy a inaktivují inhibitory plazmatickým proteináz. Působením všech těchto aktivit dochází k poškození parodontálních tkání a k narušení imunitní odpovědi hostitele. (Curtis a kol. 2001, Imamura a kol. 2003) Proteiny vnější membrány pak umožňují interakci s dalšími bakteriemi v biofilmu a pravděpodobně také ovlivňují buňky imunitního systému (How a kol. 2016).

#### **2.2.5.1.2 *Treponema denticola***

*T. denticola* je gramnegativní, obligátně anaerobní, proteolytická, pohyblivá a kultivačně náročná bakterie charakteristického dlouhého spirálovitého tvaru. Faktory virulence této bakterie zahrnují schopnost adheze na hostitelské tkáně, pohyblivost, ovlivňování imunitního systému a také cytotoxické účinky (Ishihara 2010).

*T. denticola* nemá specifické adhezni struktury, jako jsou například fimbrie, ale má schopnost přilnout k povrchům dutiny ústní pomocí různých adhezenčních faktorů na povrchu buňky (Ishihara 2010). Příkladem je protein Msp, který umožňuje vazbu na proteiny extracelulární matrix, jako jsou laminin a fibronektin (Fenno a kol. 1996) či protein OppA umožňující vazbu na fibronektin a plazminogen (Fenno a kol. 2000). Kromě adhezni funkce se Msp podílí také na koagregaci s dalšími bakteriemi a narušuje migraci a funkci neutrofilů (Ishihara 2010, Dashper a kol. 2011). Lipooligosacharid *T. denticola* se podílí na resorpci alveolární kosti nejen indukcí produkce IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ , ale pravděpodobně také prostřednictvím změn v rovnováze mezi receptorovým aktivátorem jaderného faktoru kappa

B a osteoprotegerinem (Ishihara 2010). Dalším významným faktorem virulence je dentilisin, proteáza umístěná na povrchu buněk, která umožňuje pronikání *T. denticola* do epiteliálních buněčných vrstev degradací mezibuněčných adhezních proteinů (Chi a kol. 2003). Dentilisin narušuje také hostitelskou odpověď rozkladem složek imunitního systému, například IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  (Miyamoto a kol. 2006). Kromě indukce produkce zánětlivých cytokinů je tedy *T. denticola* také degraduje. Tyto aktivity vedou k poruchám normální imunitní odpovědi a umožňují *T. denticola* vyhýbat se hostitelské obraně, přetrvávat ve tkáních a dále je poškozovat (Ishihara 2010). *T. denticola* je navíc díky neobvyklému složení vnějším membrány rezistentní vůči lidským defenzinům (antibakteriální peptidy produkované epiteliálními buňkami), konkrétně proti beta defenzinům 1 a 2 (Brissette a Lukehart 2002, Ishihara 2010).

### **2.2.5.1.3 *Tannerella forsythia***

*T. forsythia* je gramnegativní, anaerobní, asacharolytická bakterie vřetenovitého tvaru, která byla dříve označována jako *Bacteroides forsythus*. Tato bakterie je kultivačně náročná a pro svůj růst vyžaduje přítomnost exogenní kyseliny N-acetylmuramové, komponenty peptidoglykanu. (Sharma 2010)

*T. forsythia* má na svém povrchu tzv. S-vrstvu, která kromě toho, že slouží jako ochrana, umožňuje také adhezi a invazi do epiteliálních buněk (Sakakibara a kol. 2007). Na adhezi a invazi se podílí i BspA protein, který zprostředkovává vazbu na fibronektin a fibrinogen (Sharma a kol. 1998). Tento protein, který je vázáný jak na povrchu buněk, tak sekretovaný do jejich okolí, se podílí na uvolňování prozánětlivých cytokinů a účastní se interakcí s dalšími bakteriemi (Hajishengallis 2002, Sharma 2010). Povrchové lipoproteiny *T. forsythia* rovněž stimulují produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6 a TNF- $\alpha$ ) hostitelskými buňkami a navíc indukují apoptózu gingiválních fibroblastů (Hasebe a kol. 2004). *T. forsythia* produkuje minimálně dvě proteázy (Prth a trypsin-like proteáza) které přispívají k virulenci této bakterie díky jejich schopnosti degradovat hostitelské tkáně a komponenty imunitního systému či aktivovat hostitelské degradační enzymy (Sharma 2010). Ačkoliv jde o asacharolytickou bakterii, *T. forsythia* produkuje celou řadu glykosidáz. Tyto glykosidázy mohou hydrolyzovat glykosidické vazby v oligosacharidech a proteoglykanech, které se hojně vyskytují ve slinách, subgingivální tekutině a také parodontálních tkáních, a mohou tak

poškodit funkční integritu parodontu a podpořit progresi onemocnění. Degradací oligosacharidů a proteoglykanů navíc *T. forsythia* poskytuje živiny pro další přítomné bakterie. (Sharma 2010)

### **2.2.5.2 Fusobacterium**

Bakterie rodu *Fusobacterium* jsou gramnegativní, anaerobní bakterie tvořící tyčky různých velikostí. Nejvýznamnějším zástupcem v dutině ústní je *F. nucleatum*. Jde o jednu z prvních gramnegativních bakterií vyskytující se při tvorbě zubního plaku. Tato bakterie má schopnost koagregace s množstvím grampozitivních i gramnegativních bakterií a tvoří centrální strukturní složku plaku nezbytnou pro jeho zrání. Jde o nejvíce se vyskytující gramnegativní bakterii ve zralých supragingiválních i subgingiválních placích zdravých osob i pacientů s parodontitidou. (Kolebrander a kol. 2006) *F. nucleatum* a další příbuzné druhy a poddruhy pravděpodobně nejsou samy o sobě zodpovědné za destrukci parodontálních tkání (Signat a kol. 2011), ale napomáhají rozvoji patologického biofilmu a vytváří vhodné prostředí pro růst bakterií červeného komplexu (Kolebrander a kol. 2006). Díky těmto vlastnostem jsou fusobakterie asociovány spíše s onemocněním (Griffen a kol. 2012, Kirst a kol. 2015, Szafranski a kol. 2015). Abusleme a kol. (2013) zařadil *F. nucleatum* do tzv. jádra mikrobiomu a Socransky a kol. (1998) do oranžového komplexu. Mezi faktory virulence *F. nucleatum* patří například indukce IL-8, kolagenázy 3 či serinové proteázy. Nicméně, ve srovnání s proteolytickou aktivitou jiných parodontálních bakterií je specifická aktivita této proteázy velmi nízká a *F. nucleatum* je špatný induktor imunitní odpovědi. Navíc je tato bakterie poměrně citlivá vůči cytokinům a fagocytóze. (Signat a kol. 2011).

### **2.2.6 Funkční vlastnosti mikrobiálních komunit**

Bakteriální biofilm se v průběhu parodontálního zdraví a parodontitidy neliší pouze v jeho taxonomickém složení, ale lze také pozorovat do jisté míry odlišný metabolismus a funkční vlastnosti této komunity. Metagenomické studie ukazují, že u parodontitidy jsou nadměrně zastoupeny například geny pro motilitu, biosyntézu lipopolysacharidů a dalších virulenčních faktorů (např. fimbrie, pili či hemolyziny), metabolismus methanu, bakteriální chemotaxi, peptidázy, metabolismus aminokyselin, biosyntézu mastných kyselin (zejména kyseliny máselné), degradaci extracelulární matrix, geny související s rezistencí vůči antibiotikům a kovům aj. (Li a kol. 2014, Duran-Pinedo a Frias-Lopez 2015, Kirst a kol.



2015). V mikrobiomu parodontálně zdravých osob byly hojnější například geny spojené s transportéry, systémem fosfotransferázy, transkripčními faktory, biosyntézou aminokyselin, glykolýzou a glukoneogenezí (Kirst a kol. 2015). Studie také naznačují, že genová diverzita je vyšší v biofilmech spojených se zdravím a naopak klesá s nástupem onemocnění (Li a kol. 2014).

Metatranskriptomická studie ukázala, že aktivity související se získáváním železa, syntézou lipopolysacharidů a tvorbou bičíku, jsou charakteristické pro parodontitidu, zatímco transport draslíku byl spojen s parodontálním zdravím (Duran-Pinedo a kol. 2014, Duran-Pinedo a Frias-Lopez 2015) a také, že různé metabolické aktivity jsou dobře zachovány v parodontálně zdravých i nemocných komunitách, ale organismy, které je provádějí, se mohou mezi těmito komunitami lišit (Jorth a kol. 2014). Poměrně překvapivý je fakt, že většina předpokládaných virulencních faktorů při parodontitidě je exprimována bakteriemi, které jsou obecně považovány za nepatogenní, což naznačuje, že celá komunita se během onemocnění stává více virulentní (Duran-Pinedo a kol. 2014, Duran-Pinedo a Frias-Lopez 2015). To může být vysvětleno pozměněnými podmínkami prostředí a/nebo přímým účinkem některých bakterií (například *P. gingivalis*) na genovou expresi sousedních bakterií (Mira a kol. 2017).

## **2.3 Diagnostika parodontitidy**

Diagnostikovat parodontitidu v jejím pokročilém stádiu není vzhledem k jejím projevům pro zkušeného lékaře významný problém. Problém však může být odhalit tuto diagnózu dostatečně včas, ideálně ještě před prvními klinickými projevy. Včasná diagnostika parodontitidy je velmi důležitá. Pokud se nástup onemocnění odhalí dostatečně brzy, správnou léčbou a preventivním opatřením lze postup onemocnění výrazně zpomalit či dokonce zastavit, a oddálit tak hrozící ztrátu chrupu o řadu let. Diagnostika parodontitidy je v současné době založena především na klinickém a rentgenologickém vyšetření.

### **2.3.1 Klinické a rentgenologické vyšetření**

Klinické vyšetření a stanovení diagnózy parodontitidy se opírá o typické projevy parodontitidy, jako je zánět dásní, přítomnost parodontálních chobotů a resorpce alveolární kosti. Zánět dásní se projevuje jejich krvácením, změnou barvy a změnou povrchu. Klinické

vyšetření zahrnuje zejména měření hloubky parodontálního chobotu a sledování krvácení při sondáži těchto chobotů neboli BOP (bleeding on probing), které ukazuje na aktivní zánětlivé onemocnění. Hloubka parodontálních chobotů se měří pomocí kalibrovaných sond, pomocí kterých se zjišťuje, jak hluboko proniká konec sondy pod dásně. Jako mělký parodontální chobot se určuje hloubka již 3- 3,5 mm. (Slezák 1995) Dále se sleduje například také viklavost zubů, postižení mezikořenového prostoru či ztráta parodontálního připevnění. Nutným krokem pro stanovení správné diagnózy je také rentgenologické vyšetření, na kterém je u pacientů trpících parodontitidou patrná resorpce alveolární kosti (Slezák 1995, Dřížhal a kol. 2012).

Klinické vyšetření má však řadu nedostatků. Je do značné míry subjektivní a vyžaduje zkušenosti lékaře (Limeback a kol. 2017). Největším problémem je však to, že klinické vyšetření poskytuje diagnózu až po biologickém nástupu onemocnění. Při použití měření hloubky parodontálního chobotu jako míry progresu onemocnění, musí dojít k prohloubení chobotu o 2 mm, aby se onemocnění považovalo za pokročilé. Tento způsob monitorování tedy posuzuje spíše historii než aktuální rychlost progresu. Klinické vyšetření samo o sobě neposkytuje informace o současné aktivitě nemoci, budoucím riziku ztráty parodontálních struktur, ani o předpovědi úspěšných výsledků léčby. Chyby měření jako je špatný úhel a síla snímání navíc mohou poskytnout nepřesné informace a ovlivnit tak plán léčby (Korte a kol. 2016). Z těchto důvodů je nutné vyvinutí nových metod, které by poskytovaly komplexnější informace o onemocnění, jako je včasná předpověď jeho nástupu, hodnocení aktivity nemoci a účinnosti terapie (Korte a kol. 2016, Limeback a kol. 2017, Tomáš a kol. 2017).

### **2.3.2 Mikrobiologické diagnostické testy**

Jak již bylo řečeno, hlavní příčinou parodontitidy je bakteriální infekce a složení orálního mikrobiomu parodontálně zdravých jedinců se zásadně liší od mikrobiomu pacientů s parodontitidou. Nicméně, vztah progresu onemocnění a zastoupení konkrétních taxonů je aktuálně stále ve stadiu výzkumu a mikrobiologické vyšetření nepatří mezi standardně používané metody při diagnostice parodontitidy. Určité komerčně dodávané testy jsou sice k dispozici, jejich vypovídací hodnota je však velmi omezená (viz dále.) a pojišťovny je standardně nehradí.

### 2.3.2.1 Kultivace

Bakteriální kultivace je označována jako tzv. zlatý standard mikrobiologické diagnostiky a řada našich poznatků o parodontální mikrobiologii pochází právě z kultivačních metod. Většina parodontálních patogenů je však striktně anaerobních a vyžaduje náročnou kultivaci za anaerobních podmínek. Řada bakterií orálního mikrobiomu je navíc růstově náročná a obtížně kultivovatelná, některé nelze kultivovat dokonce vůbec (Socransky a kol. 1987, Sanz a kol. 2004). Obecně se uvádí, že kultivovatelných je asi 50 % ústních bakterií (Teles a kol. 2013). Vzhledem k povaze těchto bakterií tedy není kultivace vhodnou technikou ke sledování orálního mikrobiomu a určení parodontálního zdraví či nemoci (Socransky a kol. 1987, Sanz a kol. 2004).

### 2.3.2.2 Imunologické testy

Imunologické testy využívají protilátky namířené proti bakteriálním antigenům a vizualizace této specifické reakce antigen-protilátka umožňuje detekci cílových bakterií. K vizualizaci se využívá např. imunofluorescence či enzymatická reakce. Výhodou těchto testů je jejich poměrně nízká cena a rychlost. Nevyžadují také přísnou metodologii odběru a transportu bakterií k zajištění jejich životaschopnosti. Jsou však schopny detekovat pouze ty bakteriální antigeny, proti kterým jsou namířeny dané protilátky a tedy pouze omezený počet bakterií. (D'Ercole a kol. 2008)

Příkladem testu, který byl upraven pro klinické diagnostické použití je Evalusite® (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Princip tohoto testu je založen na membránové imunoanalýze, kdy antigen reaguje s protilátkou navázanou na membráně a vzniklý imunokomplex se vizualizuje kolorimetrickou reakcí. Test Evalusite® byl navržen pro průkaz paropatogenů *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* a *P. intermedia*. Test prokázal vyšší citlivost a specifitu než bakteriální kultivace pro detekci těchto bakterií (Boyer a kol. 1996, Sanz a kol. 2004).

### 2.3.2.3 Enzymové testy

Příkladem enzymového testu je test BANA. Tento test využívá schopnosti nejvýznamnějších parodontálních patogenů *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *T. denticola* hydrolyzovat syntetický substrát trypsinu N-benzoyl-DL-arginin-2-naftylamid (BANA), zatímco většina ostatních bakteriálních druhů v zubním plaku tuto schopnost nemá. Při použití hloubky parodontálního chobotu, jako míry parodontální destrukce se ukázalo, že mělké choboty vykazovaly pouze 10 % pozitivních BANA reakcí, zatímco hluboké choboty (7 mm) vykazovaly 80-90% pozitivitu (Loesche a kol. 1990, Loesche 1992). Ve studii Dhalla a kol. (2015) byl tento test použit pro zhodnocení parodontálního stavu před a během léčby. Cílem této studie bylo zjištění přítomnosti bakterií *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *T. denticola* a stanovení vlivu léčebné metody SRP u dospělých pacientů s parodontitidou. Ukázalo se, že testy BANA statisticky korelují se závažností destrukce parodontu a autoři naznačili, že tento test může být v některých případech potenciálním diagnostickým nástrojem. I když je BANA test velmi snadný a rychlý (cca 15 min), má řadu omezení. Test nedokáže odlišit, který z výše zmíněných anaerobních druhů je ve vzorku plaku přítomen a jeho negativní výsledek nevylučuje přítomnost dalších důležitých parodontálních patogenů, dokonce ani testovaných patogenů, pokud jsou přítomny v malém počtu (Sanz a kol. 2004).

### 2.3.2.4 Molekulární metody

Vývoj molekulárních metod znamenal obrovský přelom v mikrobiologické diagnostice. Molekulární metody jsou nezávislé na kultivaci a nevyžadují tudíž živé bakterie. Identifikace bakterií se provádí přímo z klinických materiálů, ze kterých je izolována bakteriální DNA (RNA), a ta je podrobena dalšímu zkoumání. Identifikace bakterií může být provedena na základě stanovení přítomnosti určitého specifického (markerového) genu, nejčastěji se však využívá taxonomické zařazení na základě stanovení sekvence bakteriální 16S rRNA. 16S rRNA je součástí malé (30S) podjednotky prokaryotického ribozomu a její délka je přibližně 1550 bp. Gen pro 16S rRNA má hned několik vlastností, které z něj dělají optimální nástroj pro bakteriální diagnostiku. Jednou z těchto vlastností je, že je univerzálně přítomný ve všech bakteriích, lze ho tedy využít pro stanovení všech bakterií. Další důležitou vlastností je, že obsahuje jak konzervované úseky vysoce homologní u všech bakterií, tak

variabilní úseky (V1-V9) dlouhé asi 30-100bp, které jsou naopak druhově specifické a lze je proto použít k rozlišení jednotlivých bakteriálních taxonů. (Gray a kol. 1984, Woese 1987)

#### **2.3.2.4.1 Metody založené na PCR**

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda umožňující rychlé a snadné zmnožení (amplifikaci) zvoleného úseku DNA. Jednoduchá cílená PCR (Single target PCR) umožňuje detekci předpokládaných bakterií s využitím druhově specifických primerů. Jako primery se většinou používají úseky DNA homologní k vybraným oblastem genu pro 16S rRNA detekované bakterie a amplifikovaná DNA je následně detekována a vizualizovaná za pomoci elektroforézy v agarózovém gelu. Tato PCR poskytuje pouze kvalitativní informaci.

Multiplex PCR je rozšířením jednoduché PCR, při které se v jedné PCR reakci používá více než jeden pár druhově specifických primerů a umožňuje tak současnou detekci více bakteriálních druhů. Pro každý identifikovaný taxon jsou pak voleny specifické primery tak, aby bylo možné rozeznat přítomnost/nepřítomnost příslušného taxonu na základě velikosti amplifikovaného produktu.

Informaci o množství hledaných bakterií ve vzorku může poskytnout další modifikace PCR označovaná jako real-time nebo také kvantitativní PCR. Při této modifikaci není konečný produkt detekován až po skončení amplifikace, ale již v jejím průběhu, a intenzita signálu je v reálném čase korelována s intenzitou signálu referenčního vzorku o známé koncentraci DNA. K detekci vznikajícího produktu se mohou využívat fluorescenční barviva, která se vážou na vznikající DNA nebo fluorescenčně značené hybridizační sondy komplementární k úseku amplifikované DNA nacházející se mezi primery.

#### **2.3.2.4.2 Hybridizační metody**

Tyto metody využívají tzv. hybridizační sondy, což jsou uměle vytvořené jednovláknové úseky nukleových kyselin, které jsou schopny se prostřednictvím vodíkových můstků specificky vázat (hybridizovat) ke komplementárním sekvencím nukleových kyselin hledaných bakterií, a detekovat tak jejich přítomnost. Vizualizaci umožňuje radioaktivní nebo fluorescenční značení použitých sond. Hybridizační sondy mohou být zaměřeny na celou genomovou DNA nebo jen na určitou část. U prvních zmíněných hrozí riziko, že budou

zkříženě reagovat s jinými, než cílovými bakteriemi kvůli přítomnosti homologních úseků mezi různými bakteriálními druhy. Z tohoto důvodu byly pro detekci různých parodontálních patogenů vyvinuty oligonukleotidové sondy komplementární k variabilním oblastem bakteriální 16S rRNA (Dix a kol. 1990, Loesche 1992). Citlivost hybridizační metody lze zvýšit kombinací s PCR, kdy zvolený úsek bakteriální DNA nejprve amplifikujeme a teprve následně detekujeme hybridizací se specifickou sondou.

Příkladem komerčně dodávaného testu využívajícího 16S rRNA hybridizační sondy je StomaGene® (Protean s.r.o. Česká republika). StomaGene® je semikvantitativní test, který využívá 3 specifické sondy pro každý ze 7 detekovaných parodontálních patogenů (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, *A. actinomycetemcomitans* a *F. nucleatum*) (Pantůčková a kol. 2016).

Dalším příkladem je ParoCheck® 20 (Greiner Bio-one GmbH, Německo). Tento test je schopen detekovat až 20 druhů bakterií (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *Actinomyces viscosus*, *V. parvula*, *A. odontolyticus*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *C. gingivalis*, *C. concisus*, *C. gralicis*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. mitis*). Test ParoCheck® využívá amplifikaci bakteriální DNA pomocí jednoduché PCR a následnou hybridizaci druhově specifickými sondami odvozenými od určité oblasti 16S rRNA. Výsledky testu jsou pouze kvalitativní. (Pantůčková a kol. 2016)

MicroIDent® kit (Hain Diagnostika Ltd., Německo) je test využívající multiplex PCR 16S rDNA s následným použitím hybridizačních sond k detekci 5 parodontálních bakterií (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* a *T. denticola*). Test poskytuje semikvantitativní výsledky. (Eick a Pfister 2002).

Ačkoliv výše uvedené metody mohou poskytnout jisté informace o bakteriích obsažených v odebraném vzorku, jejich zásadní nevýhodou je fakt, že neposkytují informace o všech bakteriích, ale pouze o těch, na které je daná metoda cílena. Neposkytují tedy komplexní informace o všech bakteriích ve vzorku a jejich vypovídací hodnota je omezená. (Sanz a kol. 2004, Teles a kol. 2013. Dalším nedostatkem je také to, že neposkytují informace o zastoupení či vzájemných poměrech detekovaných bakterií, což snižuje praktickou

využitelnost těchto metod. Mnohé taxony mohou být přítomny jak u zdravých osob, tak u pacientů s parodontitidou, zásadní je však jejich četnost v jedné či druhé skupině.

#### **2.3.2.4.3 Sekvenační metody**

Sekvenační metody jsou založeny na určování pořadí nukleotidů v dané DNA (RNA). Pro identifikaci bakterií se nejčastěji využívá sekvenování genu pro bakteriální 16S rRNA, obvykle však pouze vybraných variabilních úseků této molekuly. DNA může být izolována a sekvenována přímo, tradičně je ale gen kódující 16S rRNA nebo jeho zvolený úsek amplifikován pomocí PCR s použitím univerzálních bakteriálních primerů zaměřených na vybranou oblast. Získané sekvence se dále porovnávají s dostupnými databázemi, které umožňují jejich přiřazení k příslušným bakteriálním taxonům. Pro orální mikrobiom je dostupná databáze HOMD (Human Oral Microbiome Database, [www.homd.org](http://www.homd.org)). Tato databáze sekvencí genů pro bakteriální 16S rRNA byla formálně založena roku 2008 a v současné době (červen 2018) zahrnuje celkem 770 bakteriálních druhů. Každému druhu nebo fylotypu v této databázi je přiděleno tzv. HOT číslo (Human Oral Taxon). Za samostatný druh (fylotyp) je pro účely HOMD považován mikroorganismus, jehož gen pro 16S rRNA vykazuje v celé své délce méně než 98,5% identitu s geny pro 16S rRNA dříve definovaných druhů. (Paster a Dewhirst 2009, Dewhirst a kol. 2010)

Průlom v rozvoji sekvenování znamenal příchod metod paralelního sekvenování, který umožňuje analýzu stovek vzorků najednou, což celý proces výrazně zrychlilo a také zlevnilo. Mezi nejpoužívanější sekvenační metody posledních let patří 454 pyrosekvenování a Illumina, tzv. sekvenační metody druhé generace. Metoda 454 pyrosekvenování byla na trh uvedena v roce 2005 a šlo o první prakticky použitelnou, komerčně úspěšnou metodu, která umožňovala sekvenovat poměrně dlouhé úseky DNA (až 1000 bp<sup>5</sup>). (Margulies a kol. 2005, Di Bella a kol. 2013). Nevýhodou této metody je, že často generuje chyby v tzv. homopolymerních traktech, tj. oblastech, kde se jeden nukleotid několikrát opakuje, a také její vyšší cena vzhledem ke konkurenční metodě Illumina. Popularita této metody byla časem ovlivněna pokrokem právě metody Illumina a v současné době již není výrobcem podporována. Technologie Illumina je přesnější, poskytuje větší sekvenční hloubku a zároveň

---

<sup>5</sup> Párů bází

je méně nákladná. Na druhé straně je však schopna analyzovat jen kratší úseky DNA (cca do 600 bp). (Di Bella a kol. 2013)

S ohledem na limitaci těchto metod co do délky sekvenovaných úseků je nutné věnovat pozornost výběru sekvenovaného úseku 16S rDNA pro konkrétní účel tak, aby bylo možno bezpečně rozlišit taxony nebo komunity, které jsou předmětem našeho zájmu (Youssef a kol. 2009, Kim a kol. 2011, Di Bella a kol. 2013). Výběr správné variabilní oblasti závisí na různých faktorech specifických pro daný experiment a druh vzorku, včetně předpokládaných bakterií, a různá doporučení se mohou lišit (Di Bella a kol. 2013). Youssef a kol. (2009) například doporučuje oblasti V4, V5-V6 a V6-V7, Kim a kol. (2011) pak oblasti V1-V3 a V1-V4. Variabilní oblasti se mezi jednotlivými druhy liší různými způsoby, některé druhy mohou být rozlišeny v jedné variabilní oblasti a nikoliv v jiné a naopak. Může tedy dojít k tomu, že blízké příbuzné druhy není možné odlišit. Dalším faktorem, který může ovlivnit výsledky je, že počet kopií genu pro 16S rRNA v jednom genomu se může pohybovat od 1 do 15 i více. Navíc byly zaznamenány i jisté variace mezi těmito kopiemi (Větrovský a Baldrian 2013). Tento fakt může také ovlivnit odhad četnosti a rozmanitosti jednotlivých taxonů ve vzorku. Odhady četnosti identifikovaných taxonů založené na počtech 16S rRNA sekvencí mají tendenci podhodnocovat četnost taxonů s nízkým počtem kopií 16S rRNA v genomu a naopak nadhodnocovat ty s vyšším počtem těchto kopií. Výsledky je tedy vhodné normalizovat přepočtem na počet kopií 16S rRNA na genom. I přes určité faktory, které mohou do jisté míry ovlivňovat interpretaci výsledků, a které je třeba je brát na vědomí, sekvenace variabilních úseků bakteriálního genu pro 16S rRNA zůstává jedním z nejužitečnějších nástrojů pro studie bakteriální komunity. (Di Bella a kol. 2013, Větrovský a Baldrian 2013)

Rozvoj metod paralelního sekvenování přinesl mnoho nových informací také do problematiky parodontitidy. Pomocí těchto metod byly identifikovány další bakteriální druhy, které jsou spojovány jak s parodontálním zdravím, tak s parodontitidou a bylo zjištěno, že orální mikrobiom je mnohem rozmanitější a složitější, než se předpokládalo. Obrovskou výhodou je, že pomocí sekvenačních metod můžeme identifikovat všechny bakteriální taxony přítomné v daném vzorku. Můžeme se tedy na orální mikrobiom podívat jako na celek, nikoliv pouze jako na vybraný soubor taxonů, jak je tomu u výše uvedených metod. Získané výsledky lze navíc považovat za semikvantitativní (sekvence častěji se vyskytujících taxonů



jsou identifikovány s vyšší četností než sekvence vzácnějších taxonů). Získáme tedy informace o poměrném zastoupení taxonů v daném vzorku, což je velmi důležité. Tento komplexní pohled, který moderní sekvenační metody poskytují, ukazuje jejich potenciál stát se užitečným nástrojem pro vyhledávání jedinců se zvýšeným rizikem parodontitidy, pro její včasnou diagnostiku a pro správný výběr a monitorování léčby. Vysocí výkonné sekvenační technologie se navíc stále zlepšují ve své kvalitě, rychlosti a ceně.

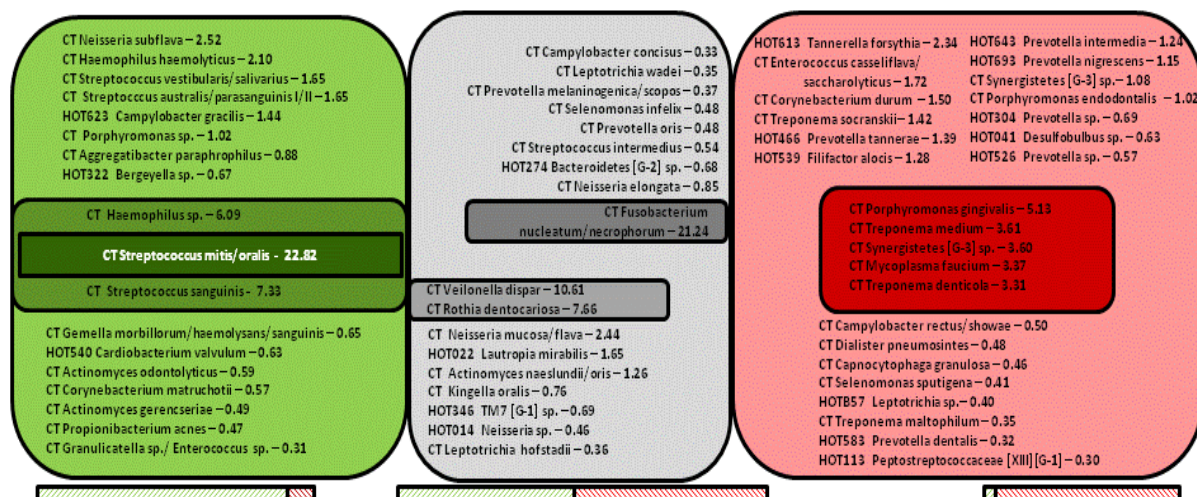
### 3. Dosavadní výsledky

Tato diplomová práce je součástí dlouhodobého projektu, který se zabývá studiem orálního mikrobiomu u pacientů s parodontitidou a u parodontálně zdravých osob. V první fázi této studie byla využita sekvenační metoda 454 pyrosekvenování pro porovnání taxonomického složení orálního mikrobiomu u 20 parodontálně zdravých osob a 15 pacientů s chronickou parodontitidou. K zařazení do skupiny H (tedy mezi parodontálně zdravé osoby) bylo požadováno, aby osoby neměly žádné parodontální choboty s hloubkou větší než 3 mm. Věkový průměr této skupiny na počátku studie byl 41 let (25-68). Ve skupině ChP (pacienti s chronickou parodontitidou) měl každý pacient nejméně dva parodontální choboty o hloubce větší než 6 mm, počet parodontálních chobotů byl 2 až 20. Průměrný věk osob v této skupině byl 49 let (42-66). Obě skupiny byly genderově vyvážené. Subjekty nebyly v posledních třech měsících před zahájením studie léčeny antibiotiky ani parodontální léčbou a kromě parodontitidy (ve skupině pacientů) byly v dobrém zdravotním stavu

Vzorky pro charakterizaci orálního mikrobiomu byly odebrány u zdravých kontrol z dásňového žlábků a u pacientů z parodontálních chobotů. Pro odhalení přirozené individuální dynamiky orálního mikrobiomu byly vzorky odebírány u obou skupin celkem 3x a to v čase 0, po 14 dnech a po 2 měsících po první odběru a dále byla skupina sledována po 3, 5 a 7 letech. U pacientů s chronickou parodontitidou byla navíc po prvním odběru aplikována antimikrobiální terapie a v dalších 2 odběrech byl sledován vliv podání antimikrobiální látky na taxonomické složení mikrobiomu v parodontálním chobotu.

První odběry zdravých osob i pacientů s chronickou parodontitidou (tedy odběry neovlivněné podáním antimikrobiální látky) byly využity pro definování typického taxonomického složení orálního mikrobiomu při parodontálním zdraví a při parodontitidě. Pro vyhodnocení byly uvažovány pouze taxony splňující podmínku významnosti, která byla definována jako minimální průměrné zastoupení 0,3 % u skupiny ChP nebo skupiny H a minimální prevalence nejméně u 7 z 15 pacientů nebo u 10 z 20 zdravých osob. Tuto podmínku splnilo 62 (z identifikovaných 311) taxonů (HOT nebo CT), které byly rozděleny do skupin podle poměru jejich průměrné celkové abundance v H a ChP, podobně jako v práci Abusleme a kol. (2013), viz obr. 4. Tyto taxony byly rozřazeny do tří skupin: taxony převládající u parodontálně zdravých osob (3x vyšší průměrná relativní abundance u H než u

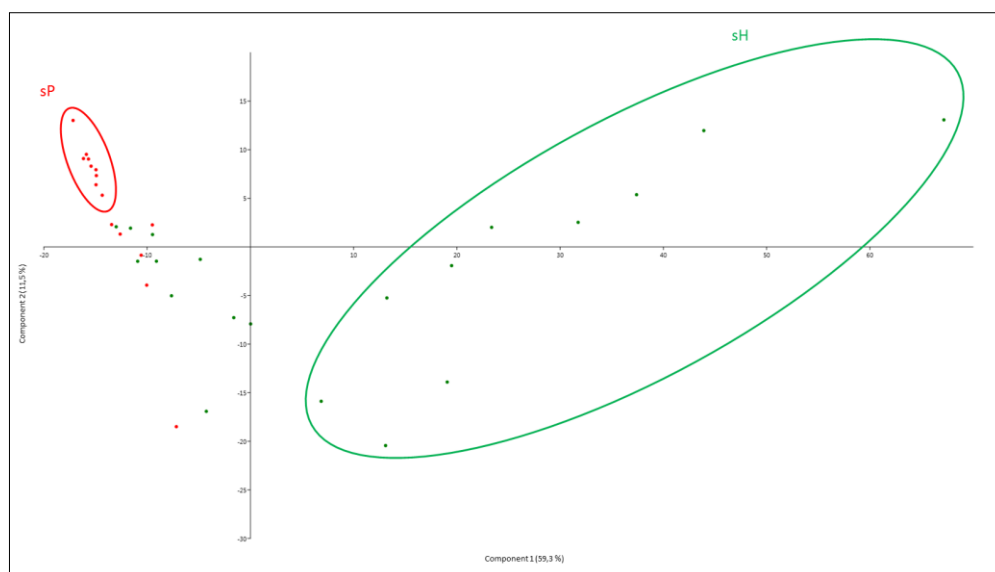
ChP; zeleně na obr. 5), taxony převládající u osob s parodontitidou (3x vyšší průměrná relativní abundance u ChP než u H; červeně na obr. 5) a taxony s vyváženou abundancí u obou skupin (všechny zbývající; šedě na obr. 5).



**Obrázek 5 Taxonomické složení orálního mikrobiomu u pacientů s parodontitidou a u zdravých kontrol**

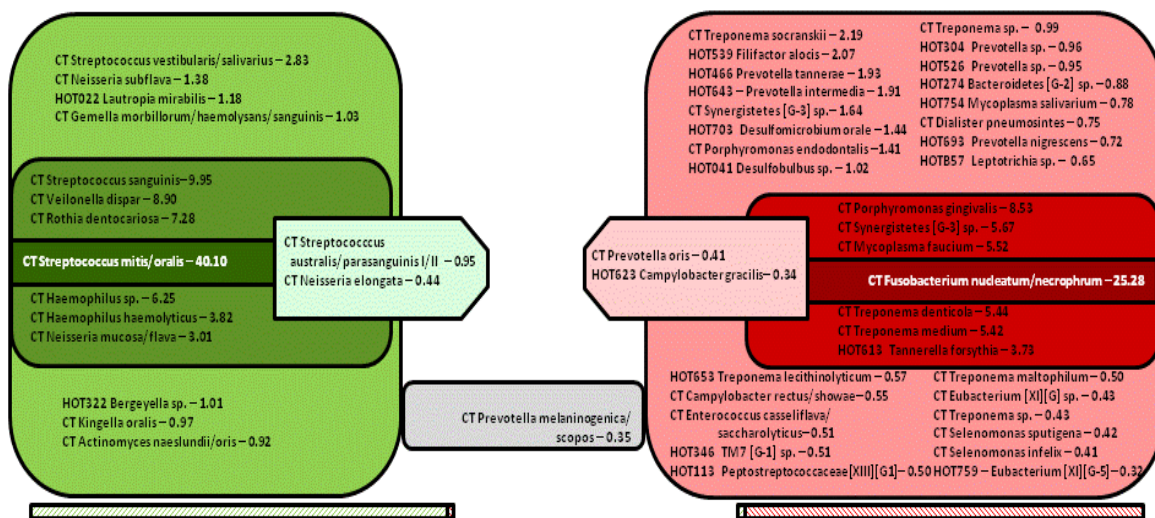
Bakteriální taxony uvedené v zelených tvarech vykazují alespoň 3x vyšší průměrnou relativní abundanci u zdravých kontrol než u pacientů a naopak bakteriální taxony uvedené v červených tvarech vykazují průměrnou relativní abundanci 3x vyšší u pacientů než u zdravých kontrol. Zbývající taxony v šedých tvarech se vyskytují srovnatelně v obou skupinách. Čísla za pomlčkou znázorňují průměrnou relativní abundanci v dané skupině a barevná intenzita daného tvaru odkazuje na tuto hodnotu. Délka zeleno-červené lišty pod každým tvarem odpovídá součtu průměrných relativních abundancí všech taxonů přidělených danému tvaru v celé skupině testovaných osob a zobrazuje příspěvek jednotlivých skupin bakterií

PCA analýza vzorků obou skupin jednoznačně oddělila skupinu pacientů s nejtěžší formou parodontitidy (největší počet postižených zubů, nejhlubší choboty) a naproti tomu byla vybrána podobně velká odděleně klastrující skupina zdravých osob (viz obr. 6). Na tomto výběrovém souboru nejvíce postižených pacientů a naproti tomu parodontálně zdravých osob s nejodlišnějším mikrobiálním profilem, byla znovu provedena analýza relativního zastoupení identifikovaných taxonů.



**Obrázek 6 PCA analýza pro výběr podskupin vzorků**  
 Červené tečky označují pacienty ChP ,zelené tečky zdravé kontroly H.  
 Barevné ovály odlišují subjekty se zřetelně rozdílnými bakteriálními profily a  
 definují výběr podskupin vzorků.

Kritéria signifikance splňovaly ty bakteriální taxony, které se vyskytovaly nejméně u 4 z 9 ChP nebo 5 z 10 H a zároveň vykazovaly průměrnou relativní abundanci minimálně 0,3 % v jedné ze skupin. V tomto případě kritéria signifikance splnilo pouze 53 bakteriálních taxonů. Ve srovnání s analýzou celých skupin testovaných osob byla překvapivě pozorována odlišná distribuce taxonů (viz obr. 7). Při použití stejného algoritmu vznikly de facto pouze dvě skupiny bakterií (červené a zelené). Taxony, vyskytující se dříve v šedé zóně při hodnocení výběrového souboru, neodpovídaly kritériím významnosti nebo byly přiřazeny buď k taxonům spojeným se zdravím, nebo naopak k parodontitidě. Jedinou výjimkou, která v šedé zóně zůstala, je *Prevotella melaninogenica* . Distribuce většiny taxonů (kromě taxonů v nejsvětlejších tvarech) navíc splňovala ještě přísnější kritérium a to takové, že tyto taxony vykazovaly ve skupině charakteristické pro parodontitidu 10x vyšší průměrnou relativní abundanci než ve skupině charakteristické pro parodontální zdraví (a naopak).



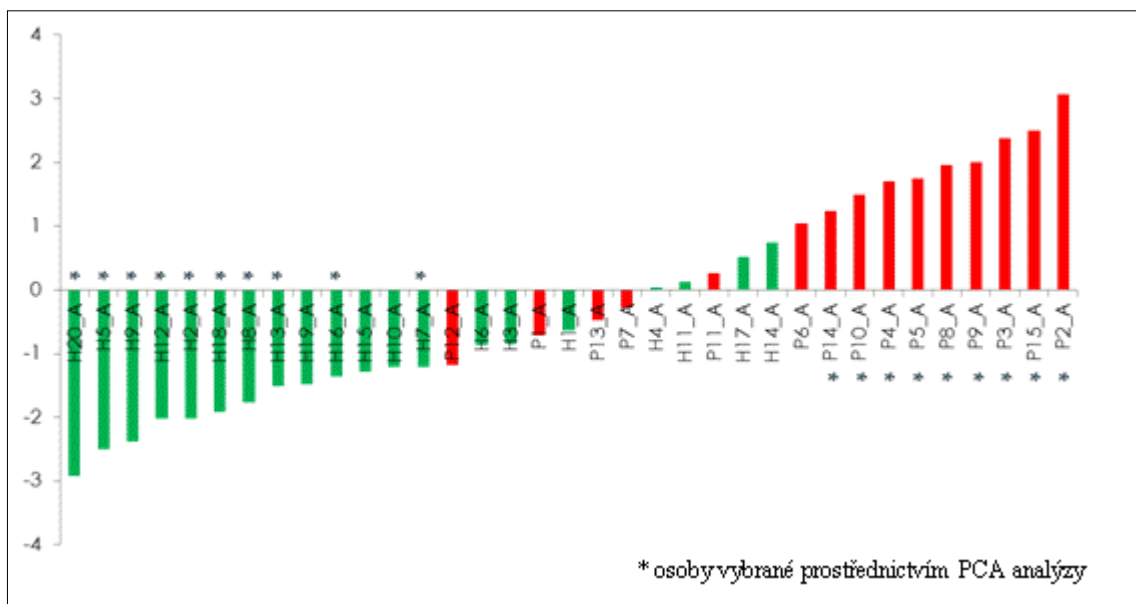
Obrázek 7 Složení orálního mikrobiomu u pacientů s parodontitidou a u parodontálně zdravých osob, definováno pro výběrový soubor

Rozdělení bakteriálních taxonů na základě dat získaných z celého souboru testovaných osob odpovídá modelu Abusleme a kol. (2013), tedy zahrnuje šedé jádro obsahující taxony, které se vyskytují ve stejném množství u zdravých osob i parodontitidy a dále dvě skupiny taxonů charakteristické pro parodontální zdraví a pro parodontitidu. Pokud však stejným způsobem hodnotíme nejvíce postižené pacienty (nejvíce postižených zubů, nejhlubší parodontální choboty) a jako protiklad k nim odpovídající skupinu zdravých osob, šedé jádro zcela vymizí a orální mikrobiom nejvíce postižených pacientů a nejzdravějších osob se vůbec nepřekrývají.

### R / G poměr - koeficient parodontálního onemocnění

Na základě vyhodnocení poměru relativních abundancí taxonů asociovaných s nemocí (červené taxony, označované „R“ z anglického „red“) a taxonů asociovaných s parodontálním zdravím („G“, neboli zelené taxony) byl definován tzv. koeficient parodontálního onemocnění, neboli R/G poměr (logaritmus podílu sumy R a G taxonů. Tato hodnota by měla jednoduchým způsobem charakterizovat orální mikrobiom a naznačit případné riziko vzniku a rozvoje parodontálního onemocnění. Při vynesení hodnot R/G poměru pro celý testovaný soubor do grafu (obrázek 8) vznikne de facto spojitá křivka od nejvyšších záporných hodnot pro „nejzdravější osoby“ až po nejvyšší kladné hodnoty pro pacienty s nejvýraznějšími

klinickými příznaky onemocnění. V prostřední části grafu (hodnoty cca od -1 do +1) dochází k mísení zdravých osob a pacientů. Předpokládáme, že u klinicky zdravých osob v tomto pásmu pravděpodobně existuje zvýšené riziko vzniku parodontitidy a naopak pacienti s parodontitidou v tomto pásmu vykazují mírnější klinické známky onemocnění a lepší prognózu v případě včasného zásahu a dobré orální hygieny. Toto grafické vyjádření může ale zároveň mimikovat situaci, která by mohla nastat u jednoho jedince v průběhu času při postupném přechodu od zdraví k parodontitidě. Na rozdíl od Abusleme a kol. (2013) předpokládáme, že taxony obecně asociované s parodontálním zdravím jsou v průběhu nástupu onemocnění postupně vytěšňovány taxony spojenými s parodontitidou a u těžkých pacientů se již téměř nevyskytují.



**Obrázek 8 R/G poměr vypočtený pro celou sadu vzorků**  
 Zeleně jsou znázorněny parodontálně zdravé osoby, červeně osoby s parodontitidou

Tento předpoklad ověřujeme v dlouhodobé studii sledující již dříve ustanovenou a postupně doplňovanou skupinu původně parodontálně zdravých osob. V průběhu studie se skutečně u některých osob vyvinul parodontální chobot a došlo k rozvoji onemocnění. Jako protiklad ke skupině H je dlouhodobě sledováno i několik pacientů z dříve ustanovené skupiny ChP, z nichž u některých naopak došlo k výraznému zlepšení příznaků onemocnění.

Nově jsou v navazujícím projektu sledováni také pacienti s agresivní formou parodontitidy, jejichž orální mikrobiom je porovnáván s tím ve zdraví a při chronické parodontitidě. U těchto pacientů je také posuzována dynamika změn v taxonomickém složení orálního mikrobiomu v závislosti na použité metodě léčby. Tato diplomová práce se částečně podílí na obou výše uvedených úkolech – dlouhodobé studii i charakterizaci orálního mikrobiomu u pacientů s agresivní parodontitidou.

## **4. Cíle práce**

### **1) Posouzení shody mezi výsledky sekvenace získanými dvěma různými sekvenačními metodami.**

Jak bylo uvedeno výše, dlouhodobá studie byla od svého počátku zpracovávána s využitím sekvenační metody 454 pyrosekvenování. Od roku 2016 ovšem výrobce ukončil technickou podporu tohoto systému a nadále neposkytuje servis ani nedodává odpovídající sekvenační kity. Z toho důvodu bylo nezbytné přejít na alternativní metodu sekvenování, dnes nejčastěji využívanou platformu Illumina MiSeq. Prvním z cílů této práce tedy bylo posoudit, zda lze pokračovat v dlouhodobé studii s použitím nové sekvenační metody a porovnávat výsledky získané oběma metodami mezi sebou tak, jako by byly získané metodou jedinou.

### **2) Sledování vývoje orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob v čase, pokračování dlouhodobé studie**

V rámci tohoto cíle byla porovnávána kompozice orálního mikrobiomu testovaných subjektů v rozmezí dvou až čtyř let (v dlouhodobé studii se jedná o odběry po 3, 5 a u některých osob i po 7 letech)

### **3) Porovnání taxonomické kompozice orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou.**

V rámci tohoto cíle byla především řešena otázka, zda existují výrazné odlišnosti v mikrobiomu pacientů s agresivní formou parodontitidy vysvětlující prudký nástup a rychlou progresi onemocnění.



## **5. Materiál a metody**

### **5.1 Materiál**

#### **5.1.1 Charakterizace souborů testovaných osob**

V této práci byly zpracovávány vzorky orálního mikrobiomu třech skupin osob:

- parodontálně zdravé osoby (dále označované H)
- pacienti s chronickou parodontitidou (dále označovaní ChP)
- pacienti s agresivní parodontitidou (dále označovaní AP)

Skupina H je sledována v rámci dlouhodobé studie, ze které tato diplomová práce zpracovává vybraný časový úsek (viz dále). Pro účely statistického posouzení komparability sekvenačních metod byla skupina H rozšířena ještě o 7 vzorků parodontálně zdravých osob, které nejsou součástí dlouhodobé studie, avšak pro účely rozšíření souboru pro statistickou analýzu byly jejich vzorky vhodné. Skupina ChP byla založena spolu s H v rámci dlouhodobé studie (viz Dosavadní výsledky), ale byla použita pouze v počátku dlouhodobé studie pro posouzení individuální dynamiky mikrobiomu ve zdraví a nemoci v průběhu 3 měsíců a za účelem definování taxonů asociovaných s oběma krajními stavy, a dále už systematicky sledována není, neboť ve složení mikrobiomu nebyl očekáván žádný významný progres. Jako protiklad k mikrobiomu zdravých osob byly pro účely této práce zpracovány vzorky 7 pacientů ze skupiny ChP, ovšem tento soubor, který máme aktuálně k dispozici, je příliš malý, než aby bylo možno z výsledků vyvozovat jednoznačné závěry. Skupina AP byla nově založena v roce 2016 pro alternativní projekt a je postupně rozšiřována o nové pacienty. V rámci této diplomové práce byly zpracovány a vyhodnoceny vzorky prvních 19 pacientů.

Vzorkem pro charakterizaci orálního mikrobiomu byla ve všech případech subgingivální tekutina, odebíraná neinvazivní metodou pomocí sterilních papírových čepů. Aby výsledek charakterizace mikrobiomu nebyl ovlivněn jinou léčbou testovaného subjektu, byly vzorky odebírány nejdříve 3 měsíce po posledním perorálním užití antibiotik. Kromě parodontitidy (ve skupině s chronickou a agresivní parodontitidou) byly všechny subjekty v dobrém zdravotním stavu.

### 5.1.1.1 Charakterizace souboru parodontálně zdravých osob (H)

K zařazení do skupiny H bylo požadováno, aby osoby (na počátku studie) neměly žádný parodontální chobot s hloubkou větší než 3 mm. Tato skupina byla založena v roce 2009 a významně rozšířena v roce 2011. V roce 2016 bylo do této skupiny zařazeno 9 nových osob. V rámci dlouhodobé studie byly charakterizovány vzorky odebírané v okamžiku zařazení do studie, dále s odstupem 2 týdnů, 3 měsíců, 3 let a dále vždy po 2 letech od posledního odběru. Součástí této diplomové práce jsou vzorky odebírané po 3, 5 a u některých i po 7 letech od zahájení studie. V průběhu studie došlo u 4 osob k rozvoji parodontitidy. V tom případě byly navíc k běžně odebíraným vzorkům odebrány i vzorky ze vzniklého parodontálního chobotu. Podrobnější informace o osobách zařazených k této skupině jsou shrnuty v tabulkách 10 a 11. Vzorky patřící do skupiny parodontálně zdravých osob jsou pro přehlednost dále označovány kromě čísla vzorku také rokem odebrání a v případě vzorku odebraného z parodontálního chobotu také písmenem CH. Vzorky sekvenované metodou 454 pyrosekvenování (viz dále) jsou navíc označeny hvězdičkou (\*).

Tabulka 10 Charakteristika skupiny H- nově zařazení

Označení osoby	Ročník	Pohlaví	Rok zařazení do studie	Označení vzorků charakterizovaných v této práci
H24	1977	Ž	2016	H24 2016
H25	1979	Ž	2016	H25 2016
H26	1977	M	2016	H26 2016
H27	1977	M	2016	H27 2016
H28	1965	Ž	2016	H28 2016
H29	1965	Ž	2016	H29 2016
H30	1978	M	2016	H30 2016
H31	1967	Ž	2016	H31 2016
H32	1990	Ž	2016	H32 2016

**Tabulka 11 Charakteristika skupiny H**

Modře označené vzorky byly použity také pro statistické posouzení komptability sekvenačních metod

Označení osoby	Ročník	Pohlaví	Rok zařazení do studie	Označení vzorků charakterizovaných v této práci		
H1	1965	Ž	2009	H1_2012	H1_2014*	H1_2016
H2	1967	Ž	2009	H2_2012	H2_2014*	H2_2016
H3	1985	Ž	2011	H3_2014	H3_2016	
H4	1978	M	2009	H4_2012	H4_2014*	H4_2016
H5	1951	M	2009	H5_2012	H5_2014*	H5_2016
				H5_2016_CH		
H6	1964	M	2011	H6_2014	H6_2014_CH	H6_2016
				H6_2016_CH		
H7	1978	M	2011	H7_2014	H7_2016	
H8	1967	M	2011	H8_2014	H8_2016	
H9	1971	M	2011	H9_2014	H9_2016	
H10	1973	Ž	2011	H10_2014	H10_2016	
H11	1943	M	2011	H11_2014	H11_2014_CH1	H11_2014_CH2
				H11_2016	H11_2016_CH1	H11_2016_CH2
H14	1967	Ž	2011	H14_2014	H14_2016	
H15	1986	M	2011	H15_2014	H15_2016	
H16	1983	Ž	2011	H16_2014	H16_2016	
H17	1978	Ž	2011	H17_2014	H17_2016	
H18	1971	Ž	2011	H18_2014	H18_2016	
H20	1974	Ž	2011	H20_2014	H20_2016	
H21	1952	Ž	2009	H21_2012	H21_2014*	H21_2016

### 5.1.1.2 Charakteristika souboru pacientů s chronickou parodontitidou (ChP)

Osoby zařazené do této skupiny musely mít na počátku studie nejméně dva parodontální choboty s hloubkou více než 6 mm. Počet parodontálních chobotů se pohyboval od 2 do 20. Podrobnější informace viz tabulka 12.

Tabulka 12 Charakteristika skupiny ChP

Označení osoby	Ročník	Pohlaví	Počet zubů na počátku studie	Počet zubů s p. chobotem
CH1	1955	Ž	32	3
CH4	1961	Ž	26	6
CH6	1962	M	30	4
CH7	1956	Ž	29	4
CH10	1941	Ž	20	20
CH12	1957	M	22	4
CH15	1959	M	32	3

### 5.1.1.3 Charakteristika souboru pacientů s agresivní parodontitidou (AP)

Vzorky od osob s agresivní parodontitidou byly odebrány před zahájením parodontální léčby. Hloubka parodontálních chobotů se pohybovala od 5 do 12 mm. Podrobnosti viz tabulka 13.

Tabulka 13 Charakteristika skupiny AP

Označení osoby	Ročník	Pohlaví	Forma parodontitidy	Hloubka odebíraného chobotu
A2	1978	Ž	<i>není k dispozici</i>	7 mm
A3	1983	M	lokalizovaná	8 mm
A5	1987	Ž	generalizovaná	7 mm
A6	1978	M	generalizovaná	9 mm
A7	1979	M	generalizovaná	8 mm
A8	1971	Ž	lokalizovaná	8 mm
A9	1974	M	lokalizovaná	8 mm
A10	1989	Ž	lokalizovaná	6 mm
A11	1974	M	generalizovaná	8 mm
A12	1967	M	lokalizovaná	8 mm
A13	1975	Ž	generalizovaná	7 mm
A14	1988	M	lokalizovaná	8 mm
A15	1972	Ž	generalizovaná	8 mm
A16	1984	Ž	lokalizovaná	5 mm
A17	1976	Ž	generalizovaná	8 mm
A18	1976	Ž	lokalizovaná	8 mm
A19	1976	Ž	lokalizovaná	8 mm
A20	1995	Ž	generalizovaná	8 mm
A21	1976	M	lokalizovaná	12 mm

### 5.1.2 Komerční soupravy

**Izolace bakteriální DNA:** DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen)

**PCR:** Plain Combi PP Master Mix (Top-Bio)

**Izolace a čištění PCR produktů:** Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System  
(Promega)

**Zakoncentrování DNA:** MinElute PCR® Purification Kit (Qiagen)

**Měření koncentrace DNA ve vzorcích:** Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

### 5.1.3 Enzymy, standardy, chemikálie

Phusion® High-Fidelity DNA Polymeráza (Bio Labs)

SeaKem® LE agaróza (Lonza)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)

1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

### 5.1.4 Primery

**Primární PCR:** Univerzální bakteriální primery zaměřené na variabilní oblast V4-V5  
16S rRNA, viz tab. 14

Tabulka 14 Primery- primární PCR

Primer	Sekvence (5'-3')	Zdroj
515F	GTGCCAGCM GCCGCGGTAA	Turner a kol. 1999
907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Lane a kol. 1991
Pozn: M: A nebo C, R: A nebo G		

**Sekundární PCR:** Kombinace primerů 515F a 907R, prodloužených o sekvenci tagu, který umožní následnou identifikaci vzorků, viz tab. 15

**Tabulka 15 Primery-sekundární PCR**

Primer	Sekvence
515F_M096	ATTGCGTGTGTGCCAGCMGCNGCGG
515F_M099	ATAAAGAGTGTGCCAGCMGCNGCGG
907R_T001	AAGTCTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T003	ATGGTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T004	ATTAGTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T006	AATCGTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T007	AACCTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T008	ACCAATCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T009	ACCTTGTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T010	ATATCGTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T011	ACGACCTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T012	ATTCGTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T013	AGTCGTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T014	ATTCCATCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T015	ACCCTATCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T016	ACTTGGTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T018	ACCGTTATCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T019	AGTGTTATCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T022	ACGAGCCTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T023	AGCCATTTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
907R_T024	ATTTGCCTCCGTCAATTCMTTTGAGTTT
Pozn: M: A nebo C, N: A, C, G, T	

### 5.1.5 Použité programy

Použité programy jsou shrnuty v tabulce 16.

**Tabulka 16 Použité programy**

Název programu	Verze	Dostupný z	Citace
SEED 2	1.0.0.0.	<a href="http://www.biomed.cas.cz/mbu/lbwrf/seed/">http://www.biomed.cas.cz/mbu/lbwrf/seed/</a>	Větrovský a kol. 2018
PAST 3	1.0.0.0.	<a href="https://folk.uio.no/ohammer/past/">https://folk.uio.no/ohammer/past/</a>	Hammer a kol. 2001
Rstudio	1.1.447.0	<a href="https://www.rstudio.com/">https://www.rstudio.com/</a>	Rstudio Team 2015

## 5.2 Metody

### 5.2.1 Odběr vzorků

Zpracovávaným materiálem byla subgingivální tekutina, která byla odebírána neinvazivní metodou se sterilními papírovými endodontickými čepy (DiaDent, vel. 35). U zdravých osob byla tato tekutina odebírána z dásňového žlábků a u osob s parodontitidou z parodontálního chobotu, kde byly tyto čepy ponechány po dobu 10 s, aby se tekutina dostatečně nasála. Pro získání dostatečného množství materiálu byly pro jeden odběr vždy použity dva papírové čepy současně. Tyto čepy byly poté uloženy do mikrozkuřavky a zmrazeny na teplotu -80 °C do okamžiku zpracování. Vlastní odběr vzorků prováděl MUDr. Jaroslav Myšák.

### 5.2.2 Izolace DNA

Celková chromozomální DNA byla izolována pomocí kitu DNeasy® Blood & Tissue kit dle návodu od výrobce s jedinou modifikací, a to v kroku 12, kde bylo ke vzorku přidáno 140 µl AE pufru namísto 200 µl uvedených v návodu.

### 5.2.3 Příprava knihovny pro sekvenování

#### PCR

Z izolované DNA byl následně pomocí PCR amplifikován úsek V4-V5 16S rDNA. Tato amplifikace byla prováděna ve dvou krocích. Při primární PCR (složení a podmínky PCR viz tab. 17 a 18) byl amplifikován vybraný úsek DNA a při sekundární PCR (složení a podmínky reakce viz tab. 19 a 20) byly získané produkty specificky označeny tagy umožňujícími následnou identifikaci vzorků. K Plain Combi PP Master Mixu byl pro zvýšení přesnosti PCR reakcí přidán 1  $\mu\text{l}$  Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA polymerázy (1  $\mu\text{l}$  polymerázy k 500  $\mu\text{l}$  Plain Combi PP Master Mix). Pro zvýšení robustnosti metody byly PCR reakce prováděny pro každý vzorek ve třech nezávislých opakováních a produkty reakcí byly pro následné zpracování spojeny. Negativní kontrola měla totožné složení reakční směsi, místo vzorku však obsahovala vodu.

**Tabulka 17 Složení reakce primární PCR**

Reagencie	Na 1 vzorek PCR reakce
Plain Combi PP Master Mix	12,5 $\mu\text{l}$
Primer R (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
Primer F (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
Sterilní H <sub>2</sub> O	6,5 $\mu\text{l}$
DNA	2 $\mu\text{l}$

**Tabulka 18 Podmínky primární PCR**

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
94 °C	5 min	1
94 °C	1 min	35
60 °C	50 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1



**Tabulka 19 Složení reakce sekundární PCR**

Reagencie	Na 1 vzorek PCR reakce
Plain Combi PP Master Mix	25 $\mu$ l
Primer R (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Primer F (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Sterilní H <sub>2</sub> O	18 $\mu$ l
DNA	3 $\mu$ l

**Tabulka 20 Podmínky sekundární PCR**

Teplota	Doba trvání	Počet opakování
94 °C	5 min	1
94 °C	1 min	14
60 °C	50 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1

**DNA elektroforéza v agarózovém gelu**

Produkty 3 paralelních PCR reakcí pro každý vzorek byly sloučeny a separovány v 0,8% agarózovém gelu. Složení gelu je uvedeno v tabulce 21. Jako standard velikosti byl použit 1 Kb Plus DNA Ladder. Produkt o velikosti 400 pb byl z gelu vyříznut pro další zpracování.

**Tabulka 21 Složení agarózového gelu**

Reagencie	Množství
Agaróza	2,4 g
TAE pufr (0,04 M Tris- acetát, 0,001 M EDTA, PH 7,5-7,8)	325 ml
Ethidiumbromid	15 $\mu$ l

#### **5.2.4 Izolace a přečištění PCR produktů**

PCR produkty vyříznuté z agarózového gelu byly purifikovány pomocí kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systém přesně dle návodu od výrobce.

#### **5.2.5 Zakoncentrování DNA**

Zakoncentrování získané DNA bylo provedeno pomocí kitu MinElute PCR® Purification Kit dle návodu výrobce, v kroku 7 však bylo pro lepší výtěžek přidáno 16 µl EB pufru namísto výrobcem doporučených 10 µl.

#### **5.2.6 Měření koncentrace DNA ve vzorku**

Koncentrace DNA v každém vzorku byla měřena pomocí Qubit® 2.0 Fluorometr (Life Technologies) s použitím kitu Qubit® dsDNA HS Assay Kit a pro sekvenování následně upravena dle konkrétních požadavků servisní laboratoře.

#### **5.2.7 Sekvenační analýza**

Vlastní sekvenační analýza byla prováděna v Laboratoři environmentální mikrobiologie (Mikrobiologický ústav AV ČR), kde byly vzorky sekvenovány na platformě Illumina MiSeq (2x250 pb).

#### **5.2.8 Vyhodnocení sekvenačních dat**

Hrubá sekvenační data byla zpracována v programu **SEED 2** následujícím způsobem:

- V prvním kroku byly odstraněny všechny sekvence kratší než 365 nukleotidů.
- Dále byly vymazány sekvence primerů.
- Všechny sekvence byly zkráceny na délku 365 nukleotidů.
- Sekvence byly klastrovány na úroveň identity 98,5 % (OTU Radius: 1,5 %) a byla vytvořena tabulka operačních taxonomických jednotek (OTU, Operational Taxonomic Units), které odpovídají bakteriálním taxonům přibližně na úrovni druhu. V tomto kroku byly také automaticky odstraněny chiméry.
- Pro každý klastr byla vygenerována konsensus sekvence.

Vygenerované konsensus sekvence byly dále porovnány s databází **HOMD** (HOMD 16S rRNA RefSeq Version 14.51 (Start at position 9)) pomocí algoritmu BlastN a ke každé OTU byl přiřazen nejlépe odpovídající taxon.

Dále byla data zpracována v programu **Microsoft Excel**:

- Sekvence, ke kterým nebyl přiřazen žádný bakteriální taxon (tzv. „no hits“), byly vymazány.
- Počty sekvencí v klastrech, které byly přiřazeny ke stejným HOT (taxonům), byly sečteny.
- Byla provedena tzv. normalizace na počet kopií 16S rRNA (dle Větrovský a Baldrian 2013). Tento krok vychází ze skutečnosti, že bakteriální taxony mohou ve svých genomech nést různý počet kopií genu pro 16S rDNA. Tento počet kopií je druhově specifický a může nabývat hodnot od 1 do cca 15. Počet identifikovaných sekvencí 16S rDNA určitého taxonu tedy nemusí přesně odpovídat počtu bakterií tohoto taxonu ve vzorku, ale je nutno provést přepočítání identifikovaných sekvencí dle taxonů.
- Byl proveden přepočítání na relativní procentuální zastoupení jednotlivých identifikovaných taxonů pro každý vzorek
- V některých případech nebylo možné na úrovni identity 98,5 % přiřadit jednoznačně právě jeden HOT, neboť v konkrétním sekvenovaném a analyzovaném úseku pouhých 365 nukleotidů vykazuje více HOT identitu vyšší, často 100%, přestože při analýze celé délky 16S rDNA by rozdíly přesáhly 1,5 %, což je hranice pro zařazení k určitému HOT. V takovém případě bylo identifikovanému klastru přiřazeno jméno tzv. CT (kombinovaného taxonu), který zahrnuje všechny HOT, klastrující ve vymezeném 365 bp dlouhém úseku na hladině 98,5% společně.
- Tyto CT byly vygenerovány následujícím způsobem: Všechny sekvence 16S rDNA z databáze HOMD (HOMD 16S rRNA RefSeq Version 14.51 (Starts from position 9)) byly v programu Seed 2 zkráceny na 365 a klastrovány na

98,5 % identity stejně jako při zpracování sekvenačních dat. Kromě samostatných HOTů vzniklo také 106 klastrů obsahujících dva a více HOTů (tj. sekvencí, které v daném úseku 16S rDNA nelze na úrovni identity 98,5% jednoznačně rozlišit). Klastry byly označeny CT1- CT106. V dalším textu je pro každý CT používán pro zjednodušení pouze název prvního ze zastoupených taxonů. Seznam všech taxonů spadajících do jednotlivých CT je uveden v tab. 22 na konci této kapitoly.

- Ke každému vzorku byl tedy přiřazen soubor identifikovaných HOT/CT a jejich relativních abundancí. Takto zpracovaná data se stala výchozím materiálem pro následnou statistickou analýzu, výpočet R/G poměru a tvorbu grafů.

## **5.2.9 Statistická analýza a grafické vyhodnocení**

### **5.2.9.1 Procrustes analýza (porovnání shody výsledků získaných metodou 454 pyrosekvenování a Illumina)**

Pro posouzení možnosti navázání na dlouhodobou studii, ve které byly vzorky orálního mikrobiomu charakterizovány pomocí sekvenace metodou 454 pyrosekvenování, aktuálně více používanou metodou Illumina, byla jedna sada 28 vzorků orálního mikrobiomu zpracována 2x nezávisle oběma metodami. Výsledky byly vyhodnoceny a matice relativních abundancí získané oběma metodami byly porovnány s použitím statistického testu Procrustes (Jackson 1995, Indugu a kol. 2016). Tento test posuzuje, do jaké míry je testovaná matice „A“ bližší testované matici „B“, než náhodně vygenerovaným maticím odvozeným od „A“. Výsledná  $m^2$  může nabývat hodnot od 0 (vysoká shoda obou testovaných souborů) do 1 (absolutně náhodné matice bez jakékoli vzájemné souvislosti). Test byl opakován 999x (počet permutací) a bylo hodnoceno, v kolika procentech případů náhodně vygenerovaná matice dosáhla vyšší shody, než matice testovaná (signifikance). Test byl proveden v prostředí

Rstudio. Výběr vhodného statistického testu i jeho aplikaci a vyhodnocení provedl Dr. Daniel Morais, specialista – bioinformatik projektu C4Sys v Mikrobiologickém ústavu.

### **5.2.9.2 Tvorba heatmapy**

Heatmapa je formou grafického znázornění dat, ve kterém je každá hodnota reprezentována barvou určitého spojitého barevného spektra. Vyšší hodnoty bývají typicky znázorňovány teplými odstíny barev, zatímco nízké hodnoty barvami studenými (odtud „heat“mapa). Heatmapa znázorňující relativní abundance jednotlivých taxonů ve vzorcích orálního mikrobiomu byla vytvořena v programu Rstudio pomocí funkce heatmap.2. Pro přehlednost byly pro tvorbu heatmapy použity pouze taxony, jejichž relativní abundance alespoň v jednom z analyzovaných vzorků dosáhla 3% hranice.

### **5.2.9.3 Analýza NMDS**

Metoda NMDS (z anglického Nonmetric MultiDimensional Scaling) analyzuje libovolnou metrickou nebo semimetrickou matici vzdáleností nebo podobností (nepodobností). NMDS zobrazuje pozorované vzdálenosti/podobnosti mezi objekty v euklidovském prostoru. V této práci byla použita NMDS analýza ekologické vzdálenosti vzorků spočtené metodou Bray-Curtis. Pro NMDS analýzu byl použit program PAST 3.

V rámci této diplomové práce byly plně zpracovány vzorky skupiny H odebírané v roce 2016. Ostatní data použitá v této práci byla získána novým vyhodnocením hrubých sekvenačních dat, získaných v laboratoři v dřívějším období (přípravu knihoven pro sekvenaci těchto vzorků prováděly Mgr. Lenka Sabová a Mgr. Magdaléna Pavlíková). Vzorky sekvenované metodou 454 pyrosekvenování byly kromě vlastního sekvenování zpracovány stejně, jako vzorky sekvenované metodou Illumina, jediný rozdíl byly použité primery. Při přípravě knihoven pro 454 pyrosekvenování byly použité primery 515F / 1100R (zahrnující variabilní úseky V4-V5-V6).

**Tabulka 22 Tabulka kombinovaných taxonů**  
Názvy CT, které jsou dále v práci používány, jsou znázorněny tučně

Číslo CT	Seznam taxonů přiřazených k jednotlivým CT	Číslo CT	Seznam taxonů přiřazených k jednotlivým CT
1	<i>Selenomonas flueggei</i> ; <i>S. noxia</i> ; <i>S. dinae</i> ; <i>S. infelix</i> ; <i>Centipeda periodontii</i>	54	<i>Streptococcus anginosus</i> ; <i>S. constellatus</i> ; <i>S. intermedius</i>
2	<i>Streptococcus sp.</i> ; <i>S. tigurinus</i> ; <i>S. dentisani</i> ; <i>S. infantis</i> ; <i>S. mitis</i> ; <i>S. oralis</i> ; <i>S. peroris</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. lactarius</i>	55	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ; <i>P. uenonis</i>
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii/polymorphum/animalis/nucleatum</i> , <i>F. periodontium</i> , <i>F. naviforme</i>	56	<i>Campylobacter rectus</i> ; <i>C. showae</i>
4	<i>Actinomyces naeslundii</i> ; <i>A. viscosus</i> ; <i>A. johnsonii</i> ; <i>A. oris</i>	57	<i>Alloprevotella sp.</i>
5	<i>Streptococcus australis</i> ; <i>S. parasanguinis II</i> ; <i>S. cristatus</i> ; <i>S. parasanguinis I</i> ; <i>S. sinensis</i> ; <i>S. oligofermentans</i>	58	<i>Prevotella loescheii</i>
6	<i>Veillonella rogosae</i> ; <i>V. dispar</i> ; <i>V. parvula</i> ; <i>V. atypica</i> ; <i>V. denticarioso</i>	59	<i>Haemophilus aegyptius</i> ; <i>H. influenzae</i>
7	<i>Treponema vincentii</i> ; <i>T. medium</i>	60	<i>Campylobacter concisus</i> ; <i>C. curvus</i>
8	<i>Porphyromonas pasteri</i> ; <i>P. catoniae</i>	61	<i>Peptostreptococcus stomatis</i> ; <i>P. anaerobius</i>
9	<i>Actinomyces lingnae</i> ; <i>A. meyeri</i> ; <i>A. odontolyticus</i> ; <i>A. cardiffensis</i>	62	<i>Bifidobacterium dentium</i> ; <i>B. longum</i> ; <i>B. breve</i>
10	<i>Prevotella histicola</i> ; <i>P. melaninogenica</i> ; <i>P. veroralis</i> ; <i>P. scopos</i>	63	<i>Mycobacterium neoaurum</i> ; <i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. leprae</i>
11	<i>Treponema socranskii</i> subsp. <i>B</i>	64	<i>Actinomyces gerencseriae</i> ; <i>A. israelii</i> ; <i>A. massiliensis</i>
12	<i>Fretibacterium sp.</i>	65	<i>Catonella morbi</i>
13	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i> ; <i>A. paraphrophilus</i> ; <i>Haemophilus pittmaniae</i>	66	<i>Streptococcus downei</i> ; <i>S. sobrinus</i>
14	<i>Prevotella sp.</i>	67	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ; <i>N. polysaccharea</i>
15	<i>Parvimonas micra</i>	68	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>P. otitidis</i>
16	<i>Capnocytophaga sp.</i>	69	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>
17	<i>Selenomonas sp.</i>	70	<i>Fusobacterium necrophorum</i> ; <i>F. gonidiaformans</i>
18	<i>Lactobacillus vaginalis</i> ; <i>L. oris</i> ; <i>L. reuteri</i> genosp.1; <i>L. panis</i> ; <i>L. reuteri</i> genosp.2	71	<i>Oribacterium sinus</i> ; <i>O. parvum</i>
19	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> ; <i>L. kisonensis</i> ; <i>L. brevis</i> ; <i>L. buchneri</i> ; <i>L. rapi</i>	72	<i>Parascardovia denticolens</i> ; <i>Scardovia inopinata</i>
20	<i>Selenomonas artemidis</i>	73	<i>Acinetobacter baumannii</i>
21	<i>Selenomonas sputigena</i>	74	<i>Propionibacterium acnes</i>
22	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	75	<i>Anaerococcus prevotii</i> ; <i>A. tetradius</i>
23	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	76	<i>Leptotrichia sp.</i>
24	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i> ; <i>H. sputorum</i> ; <i>H. parahaemolyticus</i>	77	<i>Leptotrichia hongkongensis</i>
25	<i>Neisseria flava</i> ; <i>N. lactamica</i> ; <i>N. mucosa</i> ; <i>N. pharyngis</i> ; <i>N. sicca</i>	78	<i>TM7 [G-1] sp.</i>
26	<i>Eikenella sp.</i> ; <i>Kingella denitrificans</i>	79	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> ; <i>Bordetella pertussis</i>
27	<i>Neisseria weaveri</i> ; <i>N. subflava</i> ; <i>N. flavescens</i> ; <i>N. meningitidis</i>	80	<i>Streptococcus vestibularis</i> ; <i>S. salivarius</i>

28	<i>Lachnoanaerobaculum orale</i> ; <i>L. suburreum</i>	81	<i>Treponema sp.</i>
29	<i>Capnocytophaga sp.</i>	82	<i>Alloprevotella sp.</i>
30	<i>Veillonellaceae [G-1] sp.</i>	83	<i>Treponema sp.</i>
31	<i>Capnocytophaga sp.</i>	84	<i>Mogibacterium vescum</i> ; <i>M. neglectum</i>
32	<i>Lactobacillus ultunensis</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. crispatus</i>	85	<i>Porphyrobacter tepidarius</i> ; <i>Erythromicrobium ramosum</i>
33	<i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>E. casseliflavus</i> ; <i>E. saccharolyticus</i> ; <i>E. durans</i>	86	<i>Bergeyella sp.</i>
34	<i>Leptotrichia wadei</i>	87	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
35	<i>Treponema sp.</i>	88	<i>Lactobacillus gasseri</i> ; <i>L. johnsonii</i>
36	<i>Veillonellaceae [G-1] sp.</i>	89	<i>Mycoplasma genitalium</i> ; <i>M. pneumoniae</i>
37	<i>Gemella morbillorum</i> ; <i>G. Haemolysans</i> ; <i>G. sanguinis</i>	90	<i>Lachnospiraceae [G-7] sp.</i>
38	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-7]</i> [ <i>Eubacterium</i> ] <i>yurii</i> <i>subsp. schtiika/margaretiae</i>	91	<i>Treponema sp.</i>
39	<i>Staphylococcus warneri</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. caprae</i> ; <i>S. epidermidis</i>	92	<i>Gemella bergeri</i>
40	<i>Veillonellaceae [G-1] sp.</i>	93	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-4] sp.</i>
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Kluyvera ascorbata</i>	94	<i>Peptostreptococcaceae [XI][G-1]</i> [ <i>Eubacterium</i> ] <i>infirum/sulci</i>
42	<i>Treponema maltophilum</i>	95	<i>Corynebacterium tuscaniense</i> ; <i>C. mucifaciens</i>
43	<i>Streptococcus gordonii</i> ; <i>S. sanguinis</i>	96	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> ; <i>M. flavescens</i>
44	<i>Peptococcus sp.</i>	97	<i>Stomatobaculum longum</i>
45	<i>Actinomyces georgiae</i>	98	<i>Propionibacterium propionicum</i>
46	<i>Mogibacterium timidum</i> ; <i>M. diversum</i> ; <i>M. pumilum</i>	99	<i>TM7 [G-1] sp.</i>
47	<i>Aggregatibacter segnis</i>	100	<i>Pedobacter sp.</i>
48	<i>Rothia aeria</i> ; <i>R. dentocariosa</i>	101	<i>Leptotrichia hofstadii</i>
49	<i>Granulicatella adiacens</i> ; <i>Enterococcus italicus</i>	102	<i>Bifidobacterium subtile</i> ; <i>B. scardovii</i>
50	<i>Treponema denticola</i> ; <i>T. putidum</i>	103	<i>Ralstonia pickettii</i>
51	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	104	<i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>L. pentosus</i>
52	<i>Lactobacillus casei</i> ; <i>L. paracasei</i> ; <i>L. rhamnosus</i>	105	<i>Neisseria sp.</i>
53	<i>Tannerella sp.</i>	106	<i>Mycoplasma buccale</i> ; <i>M. faucium</i>

## 6. Výsledky

### 6.1 Sekvenační statistika

V této diplomové práci bylo analyzováno celkem 118 vzorků od parodontálně zdravých osob i pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou, souhrnné údaje o všech sekvenačních datech jsou uvedeny v tabulce 23.

**Tabulka 23 Charakteristika sekvenačních dat**

Počet vzorků celkem	118
Počet sekvencí celkem	545843
Počet chimér celkem	96658
Průměrný počet sekvencí na vzorek	4625,8
Průměrný počet chimér na vzorek	819,1

Pro statistické posouzení komparability výsledků získaných sekvenačními metodami 454 pyrosekvenování a Illumina byla analyzována sada 28 vzorků, souhrnné informace o sekvenačních datech jsou uvedeny v tabulce 24. Informace o počtu sekvencí a chimér pro každý vzorek jsou k nalezení v příloze diplomové práce (list 3).

**Tabulka 24 Charakteristika sekvenačních dat pro posouzení komparability výsledků získaných sekvenačními metodami 454 pyrosekvenování a Illumina**

Počet vzorků celkem	56
Počet sekvencí celkem	156557
Počet chimér celkem	20173
Průměrný počet sekvencí na vzorek	2795,7
Průměrný počet chimér na vzorek	360,2



Charakteristika sekvenačních dat pro skupiny osob H, ChP a AP je uvedena v tabulce 25, informace o počtu chimér a sekvencí v každém analyzovaném vzorku těchto skupin jsou součástí přílohy této diplomové práce (listy 4, 5, 6).

**Tabulka 25 Charakteristika sekvenačních dat pro skupiny H, ChP a AP**

<b>Skupina H</b>	
Počet vzorků celkem	57
Počet sekvencí celkem	204564
Počet chimér celkem	41523
Průměrný počet sekvencí na vzorek	3588,8
Průměrný počet chimér na vzorek	728,5
<b>Skupina ChP</b>	
Počet vzorků celkem	7
Počet sekvencí celkem	18116
Počet chimér celkem	3305
Průměrný počet sekvencí na vzorek	2588
Průměrný počet chimér na vzorek	472,1
<b>Skupina AP</b>	
Počet vzorků celkem	19
Počet sekvencí celkem	202730
Počet chimér celkem	38398
Průměrný počet sekvencí na vzorek	10670
Průměrný počet chimér na vzorek	2020,9

## **6.2 Posouzení komparability výsledků charakterizace orálního mikrobiomu získaných dvěma různými sekvenačními metodami (454 pyrosekvenování a Illumina)**

Pro posouzení možnosti zachování kontinuity dlouhodobé studie, ve které byly vzorky orálního mikrobiomu v prvních letech charakterizovány na základě výsledků 454 pyrosekvenování, i po přechodu na novou sekvenační metodu (Illumina MiSeq), byla jedna sada vzorků zpracována 2x nezávisle s použitím obou sekvenačních metod a získané výsledky byly porovnány statisticky. Pro statistické posouzení komparability obou metod byla použita sada 28 vzorků ze skupiny H, konkrétně modře zvýrazněné vzorky z tabulky 11 (kapitola Materiál a metody) a dále 7 vzorků, které však nebyly součástí dlouhodobé studie (celkový přehled sekvenovaných vzorků je uveden v elektronické příloze diplomové práce). V době přípravy této diplomové práce již nebyla na pracovišti metoda 454 pyrosekvenování dostupná, pro statistické porovnání byla zpracována hrubá data, získaná kolegyní Lenkou Sabovou v rámci předchozího projektu). Stejná templátová DNA pak byla použita v této práci pro sekvenování 16S rDNA metodou Illumina. Hrubá data z obou sekvenací byla v rámci této práce pro účely statistického posouzení komparability zpracována stejným způsobem. Zpracovaná data ve formě excelové tabulky normalizovaných (na počet kopií 16S rDNA na genom) relativních abundancí konkrétních taxonů pro každý vzorek jsou k dispozici v elektronické příloze této práce (list 7).

K vlastnímu statistickému posouzení byla použita Procrustes analýza. Byla ověřována nulová hypotéza: Míra shody mezi dvěma maticemi (454 a Illumina) není větší, než očekávané náhodné asociace mezi těmito maticemi, přičemž hodnota  $m^2$  byla počítána pro Bray-Curtis distanční matrix obou testovaných souborů. Výsledky analýzy jsou shrnuty v tabulce 26. Hodnota  $m^2$  0,1051 potvrzuje, že mezi porovnávanými soubory není významný statistický rozdíl (hodnoty blízké nule značí maximální shodu mezi maticemi, zatímco hodnoty blízké se jedné by ukazovaly zcela náhodné rozložení).

**Tabulka 26 Výsledky Procrustes analýzy**

m <sup>2</sup> („Procrustes Sum of Squares“)	0,1051
Korelace v symetrické rotaci	0,946
Signifikance	0,001
Počet permutací	999

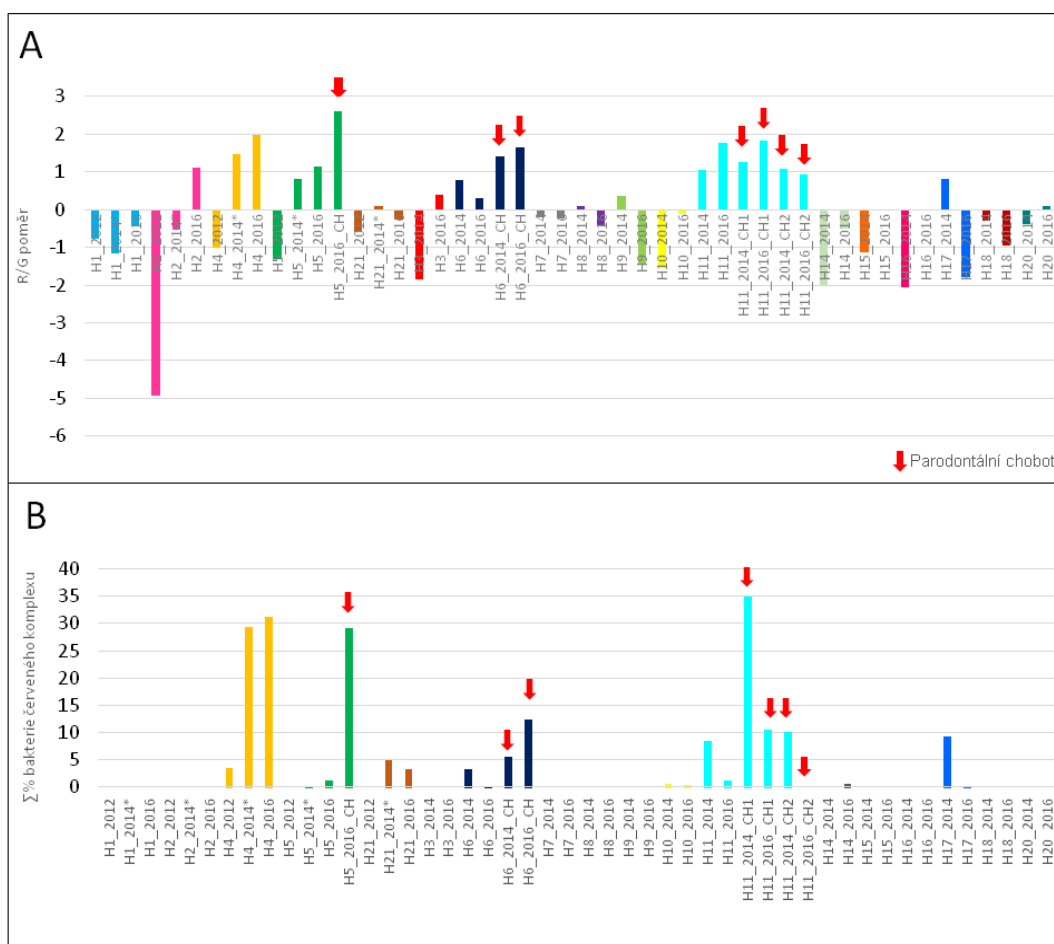
Výsledky získané pro každý jeden vzorek oběma sekvenačními metodami (454 i Illumina) jsou kompatibilní a je tedy možné v dlouhodobé studii pokračovat s použitím sekvenační metody Illumina aniž by došlo ke zkreslení výsledků v důsledku změny metodického postupu.

### **6.3 Sledování časového vývoje orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob - pokračování dlouhodobé studie**

Tato diplomová práce navazuje na dlouhodobou studii hodnocením stavu orálního mikrobiomu u skupiny parodontálně zdravých osob (H). U 13 osob byly hodnoceny vzorky získané po 3 a 5 letech od zařazení do studie, u 5 osob (konkrétně H1, H2, H21, H4, H5), které byly do studie zařazeny již v roce 2009, byly hodnoceny odběry po 3, 5 a 7 letech. Zpracovaná data ve formě excelové tabulky normalizovaných relativních abundancí konkrétních taxonů pro každý vzorek jsou k dispozici v elektronické příloze této práce (list 8).

Na základě předběžných výsledků (definice taxonů asociovaných s parodontálním zdravím a parodontitidou) byl pro jednotlivé vzorky vypočten R/G poměr (parametr parodontálního zdraví definovaný v rámci předchozí studie na pracovišti). Výsledky jsou znázorněny v grafu na obrázku 9A, hodnoty R/G poměru pro každou osobu jsou znázorněny jinou barvou. R/G poměr vyjadřuje logaritmus podílu relativního zastoupení taxonů asociovaných s nemocí a taxonů asociovaných s parodontálním zdravím, kdy záporné hodnoty jsou charakteristické pro parodontální zdraví a kladné hodnoty pro parodontitidu, hodnoty mezi -1 a +1 lze pravděpodobně považovat za přechodný stav. Přiřazení identifikovaných taxonů k parodontálnímu zdraví či parodontitidě bylo provedeno podle předběžných výsledků z první fáze dlouhodobé studie (viz dosavadní výsledky, obr 7).

Vzhledem k dosavadnímu stavu znalostí není možné bezpečně rozřadit ke zdraví a nemoci všechny identifikované taxony. R/G poměr byl stanoven na základě relativních abundancí v průměru 65% taxonů každého vzorku (nejméně 32% a nejvíce 91%). U 3 osob se v průběhu dlouhodobé studie vyvinul parodontální chobot. Jedná se o osoby H5, H6 a H11. U těchto osob byl od okamžiku diagnostikování parodontálního chobotu odebírán vždy vzorek z dásňového žlábků původního zubu a navíc nově i z parodontálního chobotu. Vzorky odebrané z parodontálních chobotů jsou na obrázku 9 označeny červenou šipkou. Vyšší hodnoty R/G poměru lze pozorovat zejména u osob, u kterých došlo v průběhu studie k vývoji parodontálních chobotů, zejména pak u vzorků odebraných z těchto chobotů. Výjimkou je osoba H4, u které byl v posledních 2 letech určen R/G poměr vyšší než 1, ačkoliv u této osoby k rozvoji nemoci nedošlo.

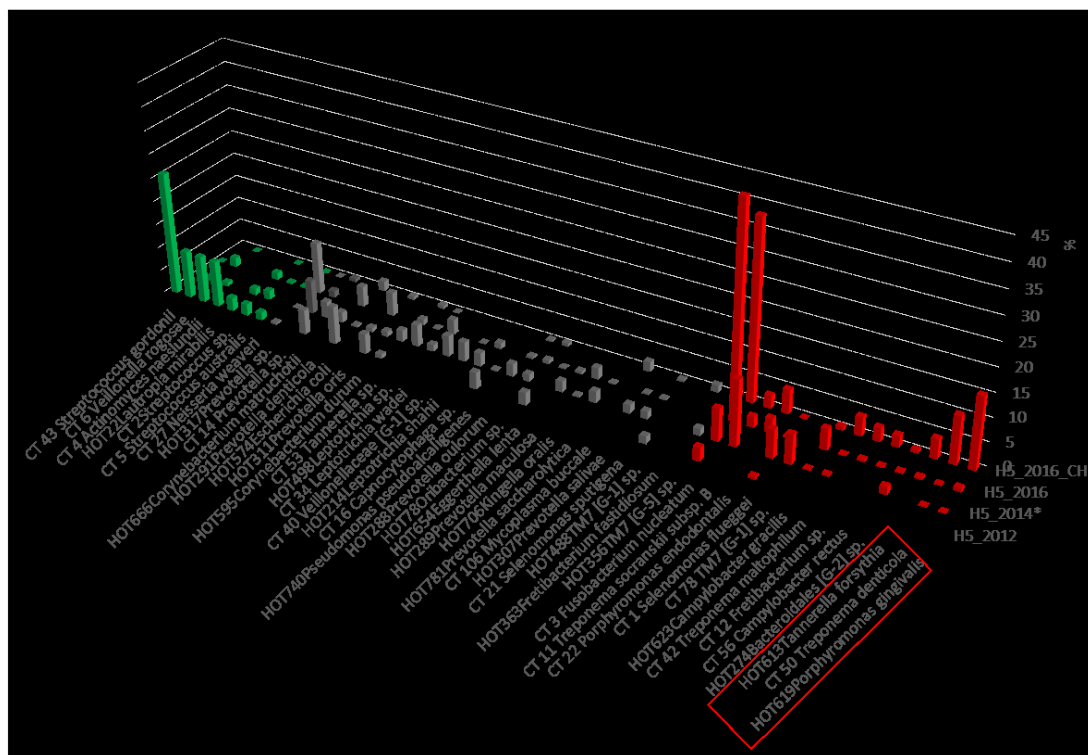


**Obrázek 9 Dynamika orálního mikrobiomu skupiny H v čase**  
 Obr. A: R/G poměr. Obr. B: četnost bakterií červeného komplexu. Hodnoty pro jednotlivé osoby jsou rozlišeny barevně

Jako další parametr k posouzení stavu orálního mikrobiomu je znázorněn součet relativních abundancí bakterií červeného komplexu (viz obr. 9B). Tyto bakterie se ve větším množství vyskytují zejména u vzorků odebíraných z parodontálních chobotů, v menším množství je však lze pozorovat i ve vzorcích odebíraných ze zdravého dásňového žlábků u týchž osob. Nejvyšší četnost bakterií červeného komplexu u osob bez parodontálního chobotu vykazuje osoba H4, v menším množství se tyto bakterie vyskytují i u osoby H21 a osoby H17 (zejm. odběr z roku 2014). Přesné hodnoty R/G poměru i součet relativní abundance bakterií červeného komplexu pro každý vzorek jsou k dispozici v příloze diplomové práce (list 8).

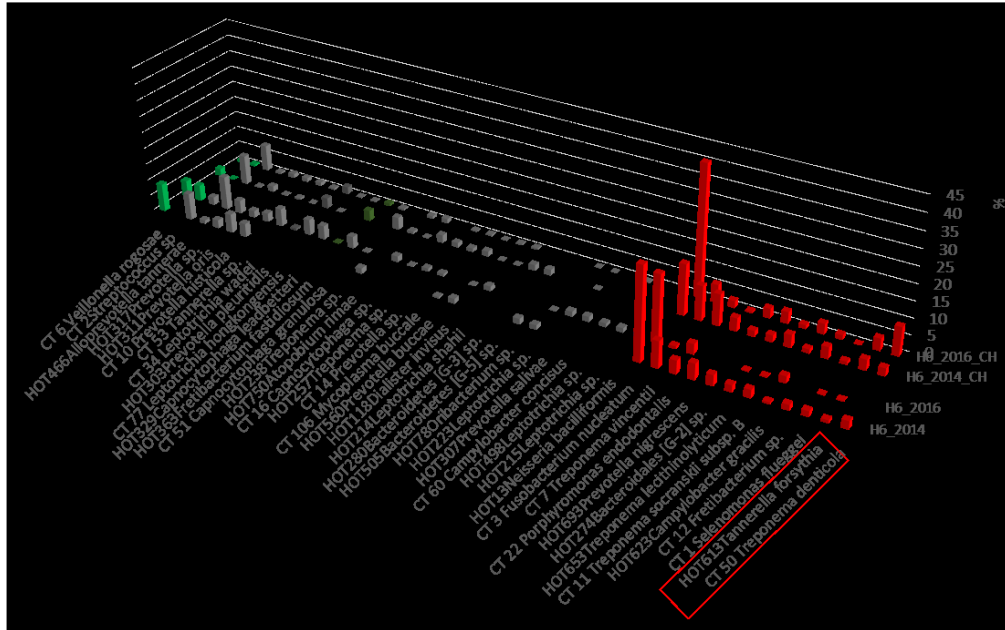
Zvláštní pozornost byla věnována osobám, u kterých v průběhu studie došlo k rozvoji parodontálních chobotů. Pro tyto osoby byly sestaveny podrobnější grafy zobrazující relativní abundance bakteriálních taxonů pro jednotlivé časové odběry. Identifikované bakteriální taxony z analyzovaných vzorků byly přiřazeny k parodontálnímu zdraví (zelená barva) nebo parodontitidě (červená barva) na základě předchozích výsledků laboratoře (viz obr. 7, dosavadní výsledky). Taxony, které nelze přiřadit k jedné nebo druhé skupině, jsou znázorněny šedou barvou. Pro přehlednost byly pro tvorbu grafů použity pouze bakteriální taxony, které byly u dané osoby identifikovány s relativní abundancí minimálně 1 % v alespoň jednom odběru.

Na obr. 10 jsou zobrazena data pro osobu H5. V odběru z roku 2012 lze pozorovat převahu taxonů asociovaných s parodontálním zdravím a téměř žádné taxony spojené s parodontitidou (výsledky sekvenace Lenky Sabové zpracovány nově pro tuto diplomovou práci). V odběru prováděném o dva roky později již dochází k úbytku taxonů spojených s parodontálním zdravím a naopak nárůstu taxonů spojovaných s parodontitidou, dokonce lze pozorovat přítomnost velmi malého množství 2 taxonů červeného komplexu. Vyšetření parodontologem však neukázalo žádné klinické příznaky onemocnění. U vzorků odebíraných v roce 2016 pak dochází k značnému nárůstu množství *F. nucleatum* a u vzorku odebíraného ze vzniklého parodontálního chobotu také k výraznému nárůstu všech bakterií červeného komplexu. Zároveň u těchto vzorků téměř chybí taxony spojované s parodontálním zdravím.



**Obrázek 10 Dynamika taxonomického složení orálního mikrobiomu u osoby H5 v čase**  
 Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

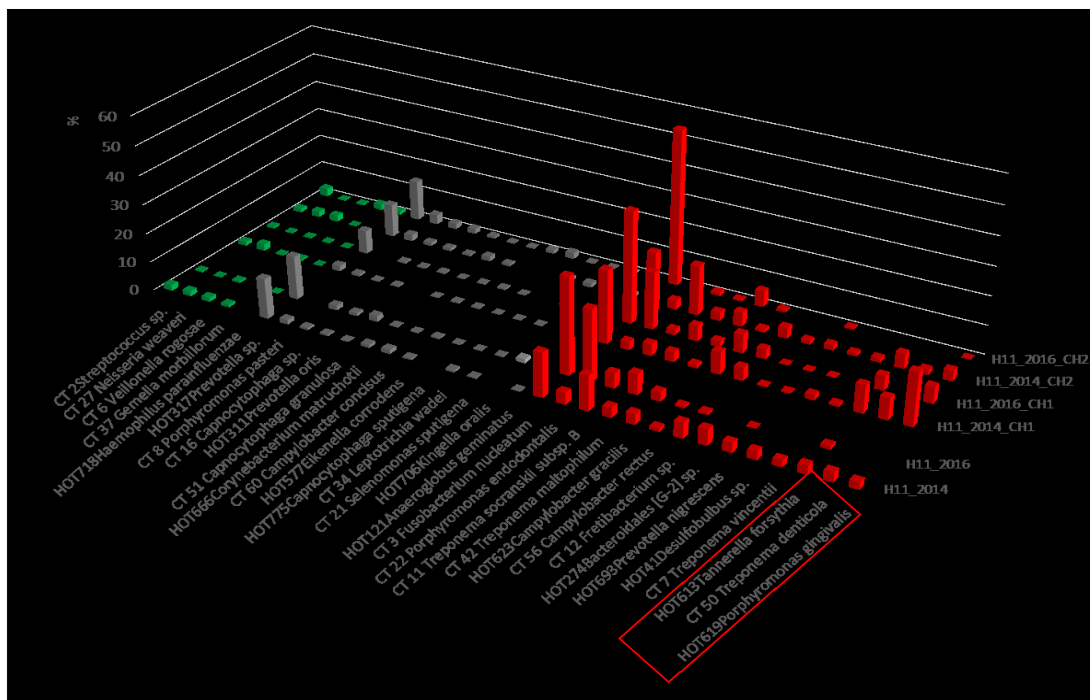
U osoby H6 (obrázek 11) byl v rámci odběru v roce 2014 identifikován parodontální chobot. V analyzovaných vzorcích z let 2014 i 2016 je patrná převaha bakteriálních taxonů spojovaných s parodontitidou a naopak minimální množství taxonů charakteristických pro parodontální zdraví, zvláště to pak platí pro vzorky odebírané z parodontálního chobotu. U vzorků odebíraných z parodontálního chobotu pak lze pozorovat také větší množství dvou druhů bakterií červeného komplexu, než u vzorků odebíraných ze zdravého dásňového žlábků. Zbývající bakterie červeného komplexu, *P. gingivalis*, se vzhledem k nízké relativní abundanci nedostala do výběru bakterií pro tvorbu grafu. Nejčtenější zastoupený taxon u vzorků odebraných ze zdravých i postižených míst je *F. nucleatum*.



**Obrázek 11 Dynamika taxonomického složení orálního mikrobiomu u osoby H6 v čase**

Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie

U osoby H11( obrázek 12) došlo v průběhu studie k rozvoji dvou parodontálních chobotů (označované jako CH1 a CH2). Oba byly identifikovány v roce 2014. Podobně jako u osoby H6, lze i zde sledovat nízké zastoupení taxonů spojených s parodontálním zdravím a převahu taxonů spojených s parodontitidou. Nejčteněji se vyskytující taxon u vzorků odebíraných ze zdravých i postižených míst je *F. nucleatum*. Nejvyšší zastoupení bakterií červeného komplexu je patrné u vzorků odebíraných z parodontálního chobotu CH1.



**Obrázek 12 Dynamika taxonomického složení orálního mikrobiomu u osoby H11 v čase**

Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

#### 6.4 Porovnání taxonomické kompozice orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou

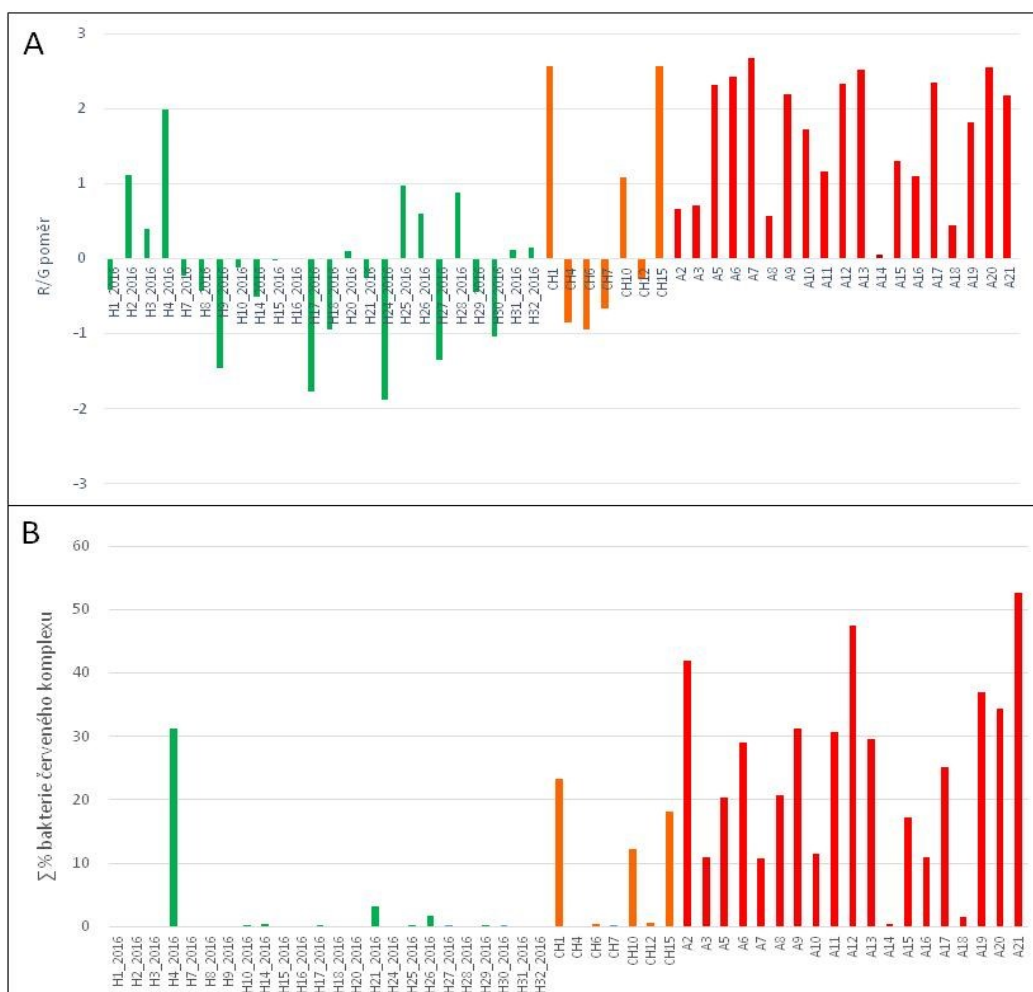
V této části práce byl charakterizován orální mikrobiom 24 osob ze skupiny H, 7 osob ze skupiny ChP a 19 osob ze skupiny AP. Ve skupině H jsou zahrnuty vzorky odebrané v roce 2016 (tj. po 5, popř. po 7 letech od zařazení do studie) těch osob, u kterých nedošlo v průběhu studie k rozvoji parodontitidy. Dále bylo do skupiny H zahrnuto 9 nových osob, zařazených do studie v roce 2016 (neboť původní sledovaný soubor nebyl dostatečně rozsáhlý, některé osoby byly z této studie vyřazeny z důvodu změny bydliště, zdravotního stavu či jiných důvodů). Osoby patřící do skupiny ChP jsou součástí dlouhodobé studie a skupina AP byla ustanovena v rámci nově vzniklého navazujícího projektu. Analýza byla



provedena vždy bez jakéhokoli ovlivnění léčebnou terapií. Zpracovaná data ve formě excelové tabulky normalizovaných relativních abundancí konkrétních taxonů pro každý vzorek jsou k dispozici v elektronické příloze této práce (list 9).

Pro posouzení stavu orálního mikrobiomu byl pro každý vzorek vypočten R/G poměr a vyneseno do grafu, viz obr. 13A, kde skupina H je zvýrazněna zelenou barvou, skupina ChP oranžovou a skupina AP červenou barvou. R/G poměr byl stanoven na základě relativních abundancí v průměru 68 % taxonů každého vzorku (nejméně 35 %, nejvíce 94%).

Ačkoliv jde o parodontálně zdravé osoby, lze u 9 z 24 osob skupiny H pozorovat kladné hodnoty R/G poměru, nejvyšší u osoby H4. U skupiny ChP jsou hodnoty R/G poměru u tří osob kladné, z toho u dvou vyšší než 2, u zbývajících 4 osob jsou hodnoty záporné. Ve skupině AP lze pozorovat pouze kladné hodnoty tohoto koeficientu z čehož u 14 z 19 osob jsou tyto hodnoty vyšší než 1. Nejnižší hodnoty vykazuje osoba A14. Dále byla u těchto vzorků posouzena souhrnná relativní abundance všech taxonů červeného komplexu (viz obr. 13 B). Jak lze pozorovat, bakterie červeného komplexu se u skupiny H prakticky nevyskytují nebo se vyskytují jen ve velmi nízké relativní abundanci. Výjimkou je osoba H4, u které součet relativní abundance bakterií červeného komplexu tvoří až 31 % všech bakterií přítomných ve vzorku, mírněji pak osoba H21 (přes 3 %) a osoba H26 (necelá 2 %). U 3 pacientů s chronickou parodontitidou se bakterie červeného komplexu vyskytují ve více než 10 %, u zbývajících nepřesahují 1 % relativní abundance. Nejvíce jsou bakterie červeného komplexu zastoupeny u pacientů s agresivní parodontitidou, kde s výjimkou dvou osob, tvoří 10 až 52 % všech bakterií detekovaných u daných osob. Nízkou relativní abundancí těchto bakterií vykazují pouze vzorky osob A14 a A18. Přesné hodnoty R/G poměru i součet relativní abundance bakterií červeného komplexu pro každý vzorek jsou k dispozici v příloze diplomové práce (list9).

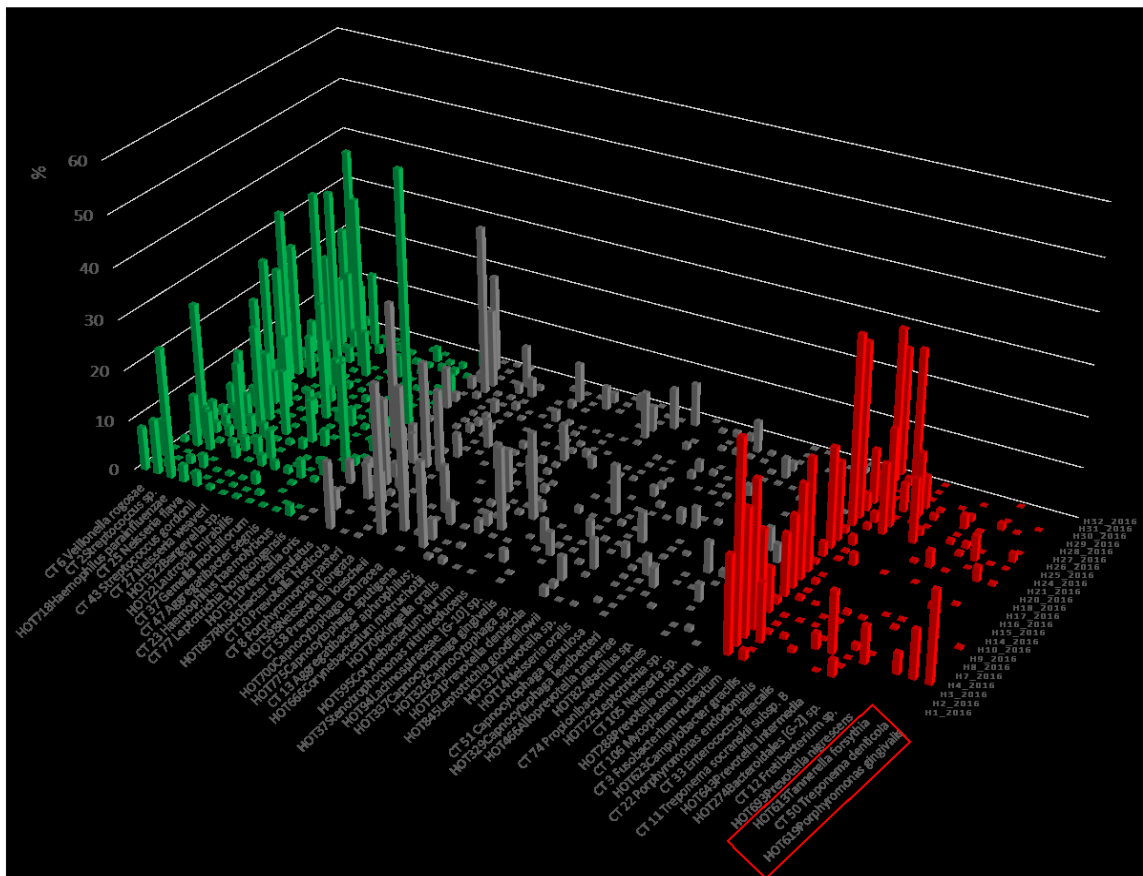


**Obrázek 13 Porovnání R/G poměru (A) a množství bakterií červeného komplexu (B) u skupin H, Chp a AP**  
 Zelená ~ skupina H, oranžová~skupina ChP, červená~ skupina AP

Pro komplexnější pohled na bakteriální profil jednotlivých skupin byly zpracovány následující grafy zobrazující bakteriální taxony zastoupené u zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou. Bakteriální taxony analyzovaných vzorků byly přiřazeny k parodontálnímu zdraví (zelená barva) nebo parodontitidě (červená barva) na základě předběžných výsledků první fáze dlouhodobé studie (viz dosavadní výsledky, obr. 7), taxony, které nelze přiřadit k jedné nebo druhé skupině, jsou znázorněny šedou barvou. Pro

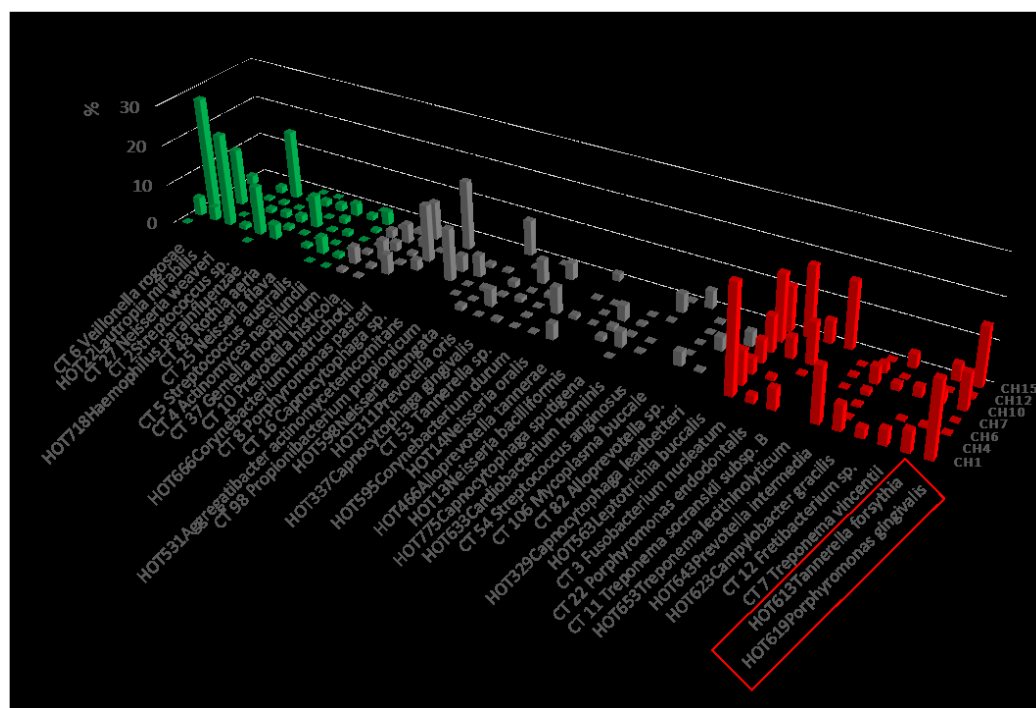
přehlednost byly v grafech zahrnuty pouze bakteriální taxony vykazující relativní abundanci minimálně 3% v alespoň jednom vzorku dané skupiny

Na obrázku 14 je zobrazen graf relativních abundancí taxonů identifikovaných ve vzorcích parodontálně zdravých osob. Lze pozorovat výraznou převahu taxonů charakteristických pro parodontální zdraví oproti taxonům charakteristickým pro parodontitidu, mezi ty nejčetnější patří *V. rogosae*, *Streptococcus sp.*, *Haemophilus parainfluenzae* a *N. flava*. Pokud se zaměříme na taxony spojené s parodontitidou, patrná je zejména přítomnost *F. nucleatum* u všech analyzovaných vzorků. Bakterie červeného komplexu se u této skupiny osob vyskytují spíše ojediněle a v malém množství. Výjimkou je osoba H4, která má na první pohled odlišný bakteriální profil než ostatní osoby této skupiny, a lze u ní pozorovat všechny tři taxony červeného komplexu a minimální množství bakterií charakteristických pro parodontální zdraví.



**Obrázek 14 Relativní abundace taxonů identifikovaných ve vzorcích skupiny H**  
 Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

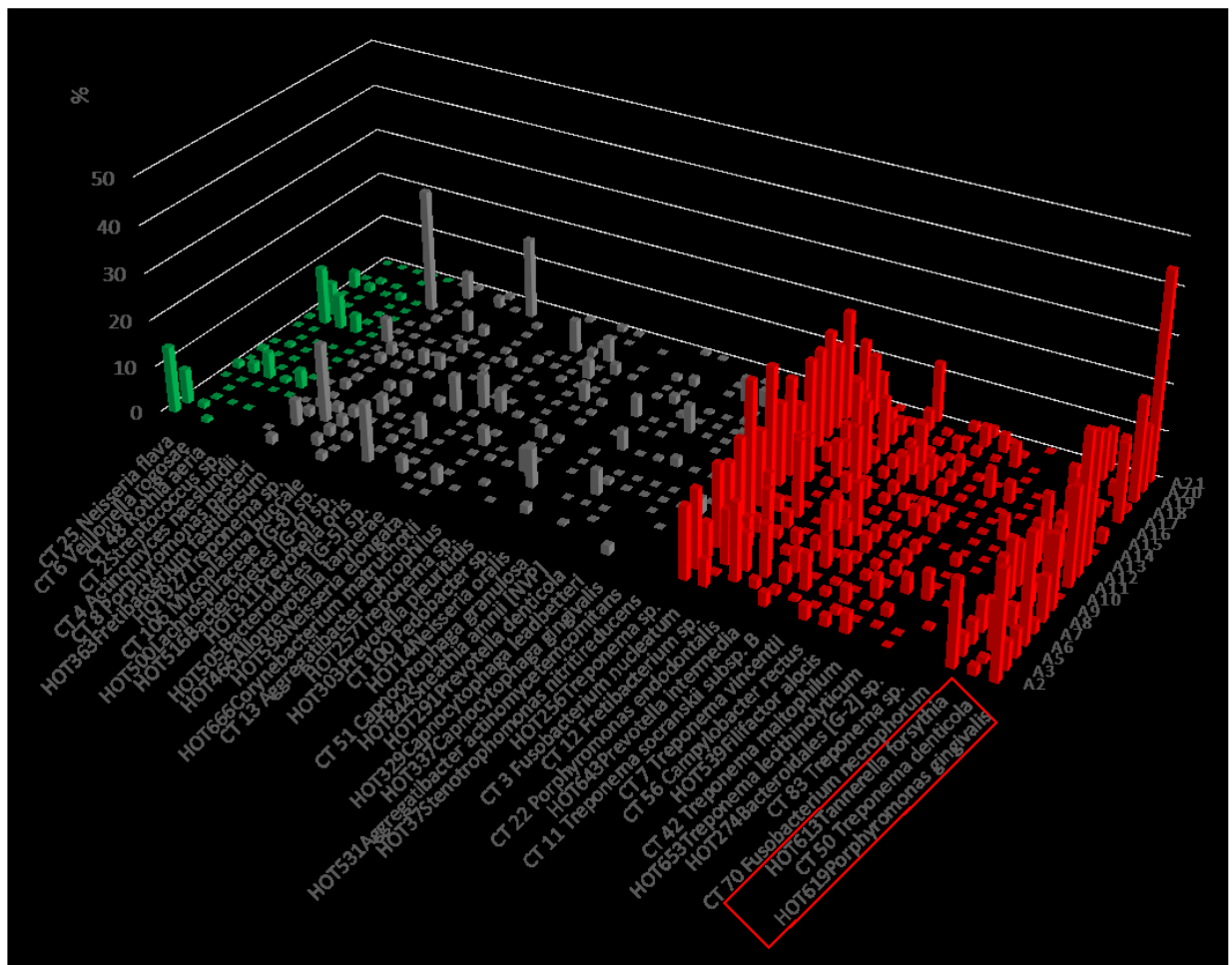
Graf na obrázku 15 znázorňuje relativní abundance taxonů identifikovaných ve vzorcích osob s chronickou parodontitidou. U osob CH1, CH10 a CH15 je, oproti ostatním osobám v této skupině, patrné zvýšené množství bakterií charakteristických pro parodontitidu, včetně dvou bakterií červeného komplexu, a to *P. gingivalis* a *T. forsythia*. Zbývající bakterie červeného komplexu, *T. denticola*, se vzhledem k nízké relativní četnosti v těchto vzorcích nedostala do výběru taxonů pro tvorbu grafu. U těchto tří osob je také patrné nižší množství bakterií charakteristických pro parodontální zdraví. U zbývajících čtyř osob převažují taxony spojené s parodontálním zdravím a bakterie červeného komplexu ani u jedné z těchto osob nepřesáhly 1 % z celkového množství všech bakterií přítomných v daném vzorku. Taxonomické složení u těchto čtyř osob připomíná spíše bakteriální profil osob ve skupině H.



**Obrázek 15 Relativní abundance taxonů identifikovaných ve vzorcích skupiny ChP**

Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

Na obrázku 16 jsou znázorněny relativní abundance taxonů identifikovaných i osob s agresivní parodontitidou. Na první pohled je patrná naprostá převaha taxonů spojených s parodontitidou, včetně velkého množství bakterií červeného komplexu. Mezi nejčtenější taxony v této skupině patří *F. nucleatum*, následovaný *P. gingivalis*. Další hojně se vyskytující taxony jsou *T. forsythia*, *Fretibacterium sp.*, *P. endodontalis*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *T. socranskii* či *T. vincentii*.

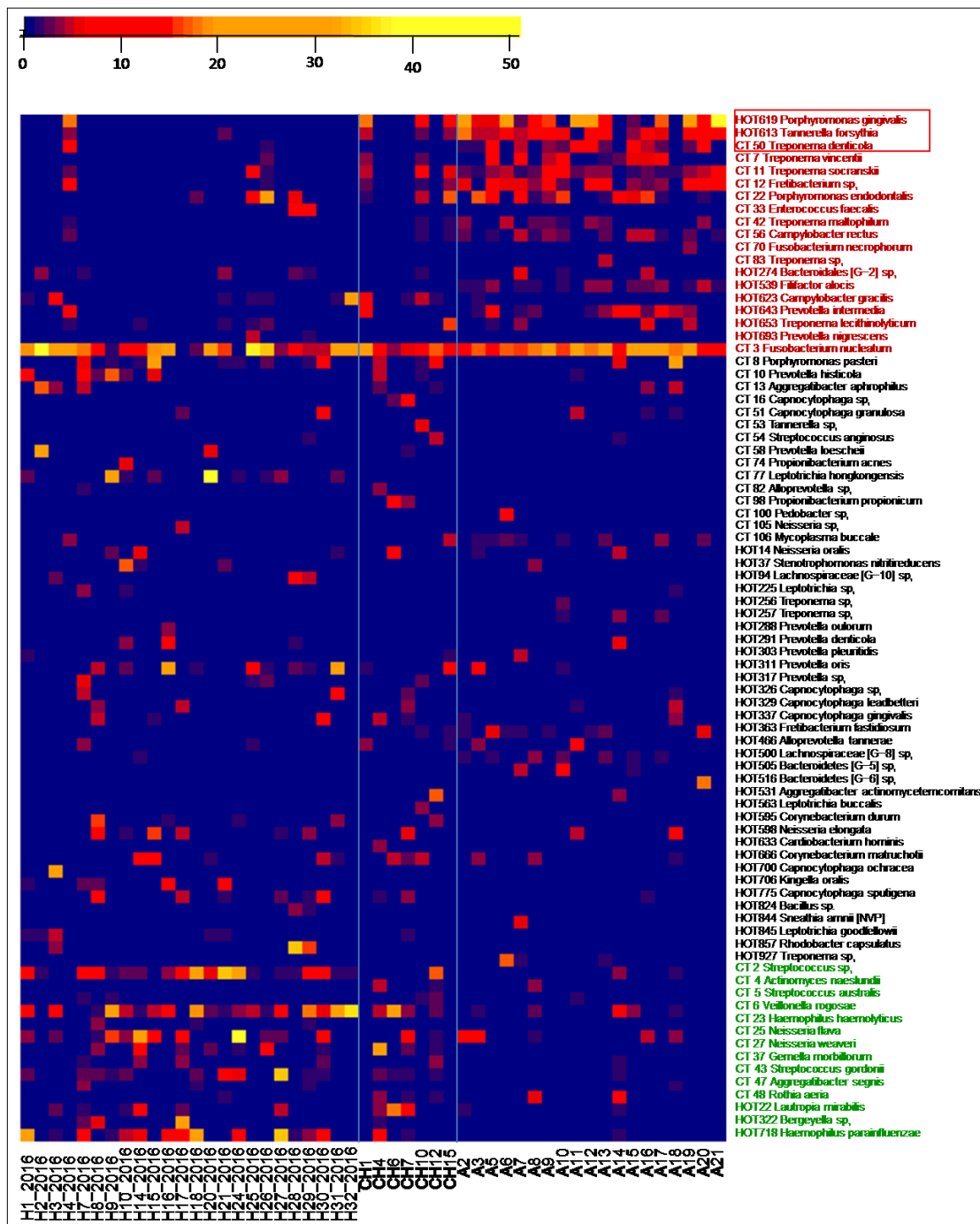


**Obrázek 16 Relativní abundance taxonů identifikovaných ve vzorcích skupiny AP**

Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, šedá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

Souhrnné přehledné porovnání taxonomického složení mikrobiomu všech skupin osob v jednom obrázku umožňuje heat mapa, kde intenzita barvy odpovídá relativní abundanci daného taxonu ve vzorku, viz obr. 17. V horní části obrázku jsou červeně zvýrazněny bakteriální taxony charakteristické pro parodontitidu, ve spodní části pak zeleně zvýrazněné taxony charakteristické pro parodontální zdraví. Ve střední části jsou bakteriální taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině. Taxony identifikované ve vzorcích byly přiřazeny k parodontálnímu zdraví či parodontitidě na základě předběžných výsledků z první fáze dlouhodobé studie (viz dosavadní výsledky, obr. 7). Pro přehlednost byly pro tvorbu heatmapy použity pouze taxony, jejichž relativní abundance alespoň v jednom z analyzovaných vzorků dosáhla 3% hranice.

U skupiny H je patrná vyšší četnost taxonů charakteristických pro parodontální zdraví a u skupiny AP naopak taxonů charakteristických pro parodontitidu. Ve skupině ChP jsou u čtyř osob více zastoupeny taxony charakteristické pro parodontální zdraví, nežli pro parodontitidu a tyto osoby mají bakteriální profil více podobný zdravým osobám. U zbylých 3 osob lze pozorovat větší četnost taxonů spojovaných s parodontitidou. Z obrázku je také dobře patrná vysoká četnost a všudypřítomnost *F. nucleatum*. Zároveň lze pozorovat poměrně velké množství taxonů, které prozatím nebyly přiřazeny k parodontálnímu zdraví ani k parodontitidě. Při větším počtu vzorků v jednotlivých skupinách bude časem jistě možné přiřadit mnohem více taxonů k jednomu či druhému stavu.



Obrázek 17 Heat mapa znázorňující relativní abundanci identifikovaných taxonů u skupin H, ChP a AP

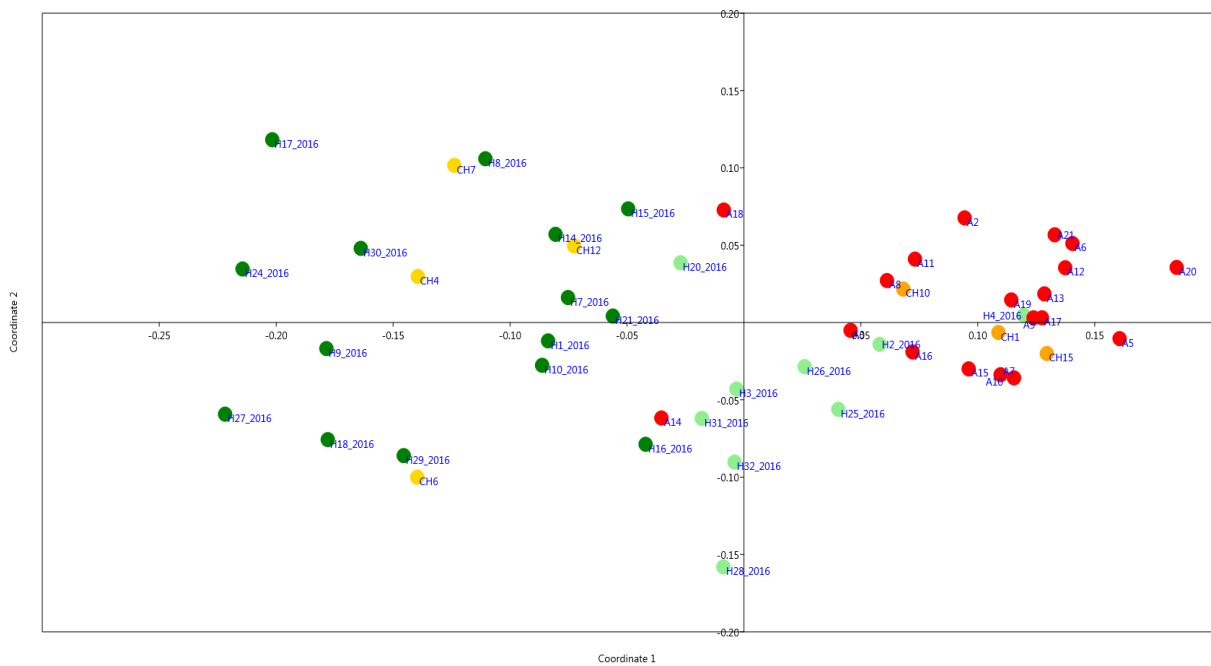
Zelená ~ taxony spojené s parodontálním zdravím, červená ~ taxony spojené s parodontitidou, černá ~ taxony, které nelze jednoznačně přiřadit k jedné nebo druhé skupině, červený rámeček ~ bakterie červeného komplexu

## **Shluková analýza**

Schopnost komplexního taxonomického profilu orálního mikrobiomu rozlišit mezi orálním zdravím a parodontitidou byla testována také pomocí shlukové analýzy NMDS na základě ekologických vzdáleností vyjádřených formou Bray-Curtis indexů, vypočtených z matice relativních abundancí identifikovaných taxonů pro každý vzorek. Pro tuto analýzu byly použity všechny identifikované taxony u všech vzorků. Skupina H je označena zelenou barvou, světlejším odstínem pak jsou zvýrazněny osoby, které měly kladné hodnoty R/G poměru. Skupina ChP je označena oranžovou barvou a jejím světlejším odstínem jsou označeny osoby se zápornými hodnotami R/G poměru. Skupina AP je označena červeně.

Z obrázku 18 jednoznačně vyplývá, že AP klastrují odděleně od H a skupiny H a ChP se vzájemně prolínají. Pokud vezmeme v úvahu znalost R/G poměru, zcela logicky spolu s AP klastrují 3 ChP s vysokým R/G poměrem a naopak ty ChP s nízkými hodnotami tohoto koeficientu se vykytují mezi osobami H. Mezi AP lze pozorovat osobu H4, která vykazovala nejvyšší hodnotu R/G poměru ve skupině H. Ostatní osoby s kladnou hodnotou R/G poměru také klastrují dohromady, odděleně od H se zápornými hodnotami R/G poměru. Dvě osoby skupiny AP, které jsou jasně oddělené od zbytku toho klastru, mají nejnižší hodnoty R/G poměru v této skupině.





**Obrázek 18 NMDS analýza pro skupiny H, ChP a AP**

Tmavě zelená ~ osoby H se záporným R/G poměrem, světle zelená ~ osoby H s kladným R/G poměrem, tmavě oranžová ~ osoby ChP s kladným R/G poměrem, světle oranžová ~ osoby ChP se záporným R/G poměrem, červená ~ AP

## 7. Diskuze

Jak již bylo uvedeno, tato diplomová práce je součástí dlouhodobé studie, která se zabývá dynamikou taxonomického složení orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů s chronickou a agresivní parodontitidou. V první fázi studie byla pro charakterizaci orálního mikrobiomu použita sekvenační metoda 454 pyrosekvenování. V průběhu studie však výrobce ukončil technickou podporu tohoto systému a proto bylo pro další pokračování studie nutné přejít na jinou sekvenační metodu. Logicky byla zvolena dnes nejčastěji využívaná platforma Illumina MiSeq. Prvním z cílů této práce bylo posoudit, zda jsou výsledky získané oběma metodami srovnatelné, a tedy zda lze v dlouhodobé studii navázat metodou Illumina na výsledky získané dříve metodou 454 pyrosekvenování, aniž by došlo k ovlivnění výstupů. Změna sekvenační metody však nebyla jediná proměnná, která by mohla ovlivnit výsledky charakterizace taxonomického složení daných vzorků, a tedy návaznost celé studie. Vzhledem k tomu, že metoda Illumina MiSeq neumožňuje sekvenování úseků delších než cca 2x 300 (a nám dostupný přístroj dokonce jen 2x250 pb), bylo nutné modifikovat postup přípravy knihovny pro sekvenování zařazením alternativního primeru. Pro sekvenování metodou 454 byly využívány primery 515F a 1100R, které poskytovaly fragmenty velikosti cca 600 pb, zatímco pro sekvenování metodou Illumina MiSeq jsou amplifikovány fragmenty o velikosti 400 pb s použitím primerů 515F a 907R. V obou případech byl použit identický forward primer. Výsledné sekvence byly v průběhu vyhodnocení zkráceny na stejnou délku 365 nukleotidů a byl hodnocen identický úsek 16S rDNA, ovšem určitá variabilita mohla být vnesena právě použitím různých revers primerů, kdy nelze vyloučit preferenční nasedání některého z těchto primerů na určité sekvence, což by v konečném důsledku znamenalo falešně vyšší počet identifikovaných sekvencí příslušného taxonu. Ideálním řešením by samozřejmě bylo provést analýzu příslušných vzorků oběma metodami s oběma kombinacemi primerů. Ovšem jak bylo řečeno výš, použít primery pro 454 pyrosekvenování na přípravu knihovny pro Illumina MiSeq 2x250 pb nelze, neboť amplifikovaný úsek je příliš dlouhý. Použít primery 515F a 907R pro sekvenování metodou 454 by sice technicky možné bylo, ale v době řešení této práce již nebyla metoda 454 dostupná. Proto byly statisticky porovnávány pouze dvě sady sekvencí pro každý vzorek:

515F/907R sekvenováno metodou Illumina MiSeq 2x 250 pb a 515F/1100R sekvenováno metodou 454 pyrosekvenování. Výsledek statistického porovnání (Procrustes analýzy) obou testovaných setů jednoznačně ukazuje, že data získaná pro stejné vzorky oběma metodami sice nejsou identická, ale vykazují velice vysokou míru korelace (0,946), a tudíž lze nově používanou metodu Illumina v rámci dlouhodobé studie navázat na výsledky získané dříve metodou 454 pyrosekvenování. Srovnání sekvenačních metod 454 pyrosekvenování a Illumina MiSeq na stejném souboru dat získaných ze 7 vzorků prováděl například Castelino a kol. (2017) při studiu kožního mikrobiomu. Ačkoliv k vlastnímu porovnání používal jinou metodu (Wilcoxonův test) i jiné primery, došel k podobnému názoru, a to že nebyl pozorován významný rozdíl mezi oběma platformami a že výsledky získané oběma metodami jsou srovnatelné.

Existuje celá řada studií, které se zabývají rozdíly ve složení orálního mikrobiomu u zdravých osob a pacientů s parodontitidou (...Socransky a kol. 1998, Tanner a kol. 1998, Paster a kol. 2001, Kumar a kol. 2005, Griffen a kol. 2012, Abusleme a kol. 2013, Li a kol. 2014, Kirst a kol. 2015, Szafranski a kol. 2015). Tyto studie však nelze jednoduše porovnávat, neboť se liší v celé řadě faktorů, jako je použitá vyšetřovací metoda, parametry definující parodontální zdraví a parodontitidu, věk, etnikum, podmínky pro přiřazení taxonů k parodontálnímu zdraví či naopak parodontitidě apod. Mnohé z nich také přiřazují identifikované taxony jen na úroveň rodu či dokonce ještě vyšších taxonů. Z těchto důvodů je obtížné převzít přiřazení taxonů k parodontálnímu zdraví nebo nemoci z některé z výše uvedených prací nebo dokonce seznamy z více studií pro účely této práce zkombinovat. Proto byly v této diplomové práci taxony identifikované u sledovaných vzorků přiřazeny k parodontálnímu zdraví či parodontitidě výhradně dle definice R a G taxonů na základě předběžných výsledků vlastní dlouhodobé studie (viz kapitola Dosavadní výsledky).

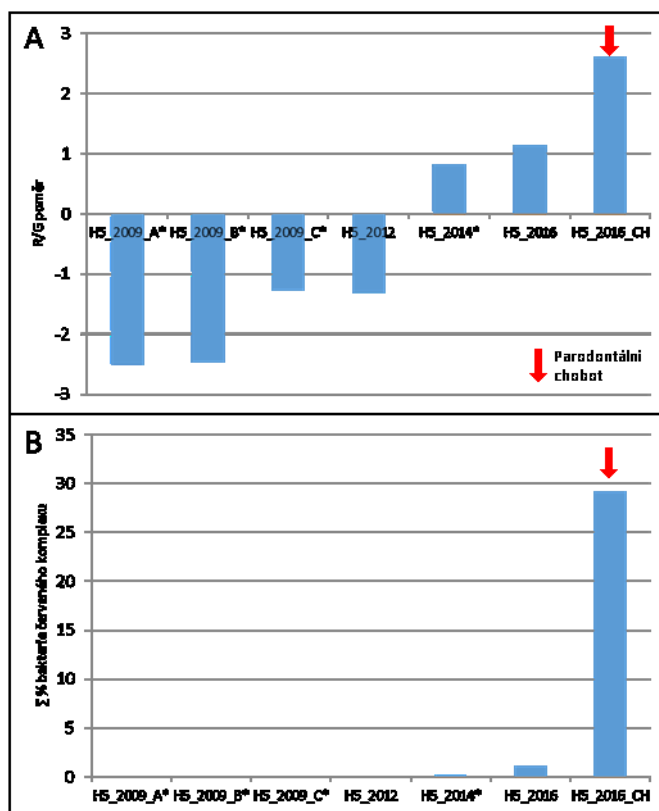
Pouhá taxonomická charakterizace orálního mikrobiomu však není vhodná pro použití v klinické praxi. Pro tento účel je nutné získané výsledky zjednodušit a popsat tak, aby jednoznačně indikovaly buď parodontální zdraví, nebo naopak parodontitidu, popř. aby indikovaly možné riziko vzniku tohoto onemocnění. V rámci první fáze dlouhodobé studie byl proto definován tzv. R/G poměr, koeficient parodontálního zdraví, který je vypočten jako logaritmus podílu relativního zastoupení taxonů asociovaných s nemocí a taxonů

asociovaných s parodontálním zdravím. Záporné hodnoty tohoto koeficientu lze považovat za charakteristické pro parodontální zdraví a kladné naopak pro parodontitidu. Hodnoty mezi -1 a +1 lze pravděpodobně považovat za přechodný stav a tyto hodnoty stanovené u parodontálně zdravých osob mohou indikovat možné riziko budoucího vývoje onemocnění a nabídat ke zvýšené pozornosti. Dalším parametrem, který byl v této práci nově sledován a který by mohl sloužit jako možný ukazatel parodontálního zdraví, je souhrnná relativní abundance bakterií červeného komplexu.

Výpočet R/G poměru i sledování relativní abundance bakterií červeného komplexu byly využity při sledování dlouhodobého vývoje orálního mikrobiomu u skupiny parodontálně zdravých osob. Zvláštní pozornost byla věnována osobám, u kterých došlo v průběhu studie k vzniku parodontálního chobotu a rozvoji onemocnění (konkrétně jde o osoby H5, H6 a H11). Pro možnost sledování dlouhodobého vývoje těchto osob jsou v grafech na obrázcích 19, 20, 21 vyneseny hodnoty R/G poměru a relativní abundance bakterií červeného komplexu pro všechny odběry těchto osob od jejich zařazení do studie, tedy včetně odběru zpracovaných kolegyní Lenkou Sabovou.

U osoby H5 (viz obr. 19) jsou do roku 2012 patrné záporné hodnoty R/G poměru spojené s parodontálním zdravím a také nepřítomnost bakterií červeného komplexu. V roce 2014 již lze pozorovat zvýšenou hodnotu R/G poměru (0,8) a také nepatrné množství bakterií červeného komplexu (0,12 %). V roce 2016 byl u této osoby diagnostikován parodontální chobot a u vzorku odebraného z toho chobotu lze pozorovat hodnotu R/G poměru 2,6 a vysokou četnost bakterií červeného komplexu (až téměř 30 % všech zastoupených bakterií). Z těchto výsledků a z grafu na obrázku 10 je patrné, že určitá změna složení orálního mikrobiomu nastává ještě před propuknutím prvních klinických projevů, a že při přechodu parodontálně zdravého mikrobiomu v parodontální dochází k postupnému snižování počtu bakterií typických pro parodontální zdraví a k nárůstu počtu těch spojovaných s nemocí. Tento model ekologické sukcese s postupnou náhradou taxonů spojovaných s parodontálním zdravím za taxony charakteristické pro parodontitidu ve své studii podpořil například Kirst a kol. (2015) a je také v souladu s předpokladem definovaným v rámci předběžných výsledků naší laboratoře. Abusleme a kol. (2013) postuloval, že k nárůstu množství taxonů

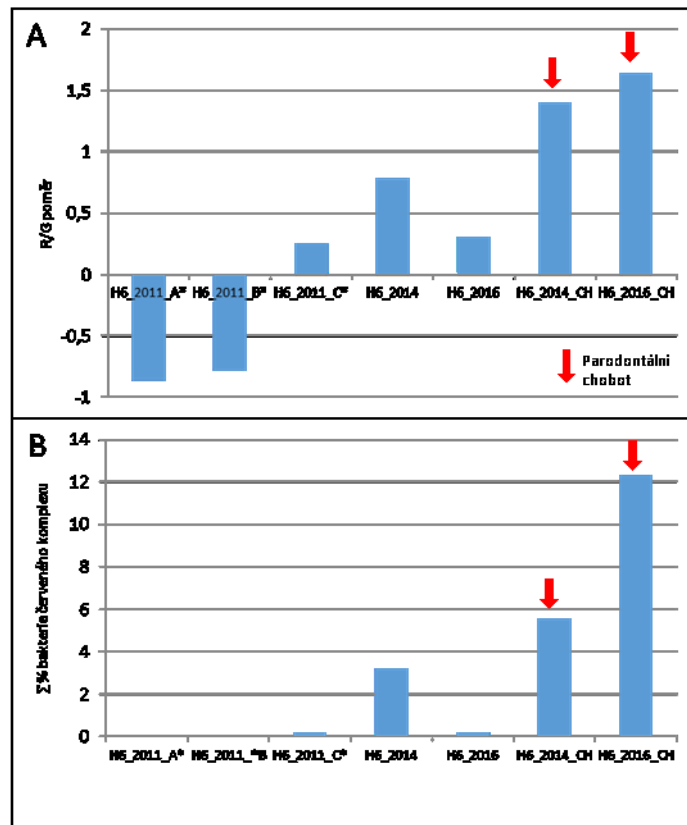
charakteristických pro parodontitidu dochází, aniž by došlo k nahrazení primárních druhů spojených s parodontálním zdravím, což je v rozporu s naším zjištěním



Obrázek 19 Porovnání R/G poměru (A) a množství bakterií červeného komplexu (B) u osoby H5 v průběhu dlouhodobé studie

Podobný trend lze pozorovat i u dalších osob ze skupiny H, u kterých se v průběhu studie vyvinul parodontální chobot. Osoba H6 (viz obr. 20) byla do studie zařazena v roce 2011. Mezi prvními třemi odběry, které proběhly na počátku studie v odstupu 2 týdnů (B) a 2 měsíců (C) od prvního odběru (A), byla značná variabilita, avšak stále v rozmezí R/G poměru -1 až +1, což je v rozmezí, které dle našeho předpokladu u parodontálně zdravých osob značí riziko vzniku parodontitidy a nutnost zvýšené dentální péče. V odběru C lze pozorovat nepatrné množství bakterií červeného komplexu. V roce 2014 byl u této osoby diagnostikován parodontální chobot a u vzorku odebíraného z tohoto chobotu jsou patrné zvýšené hodnoty R/G poměru i bakterií červeného komplexu, tyto hodnoty jsou ještě vyšší v odběru

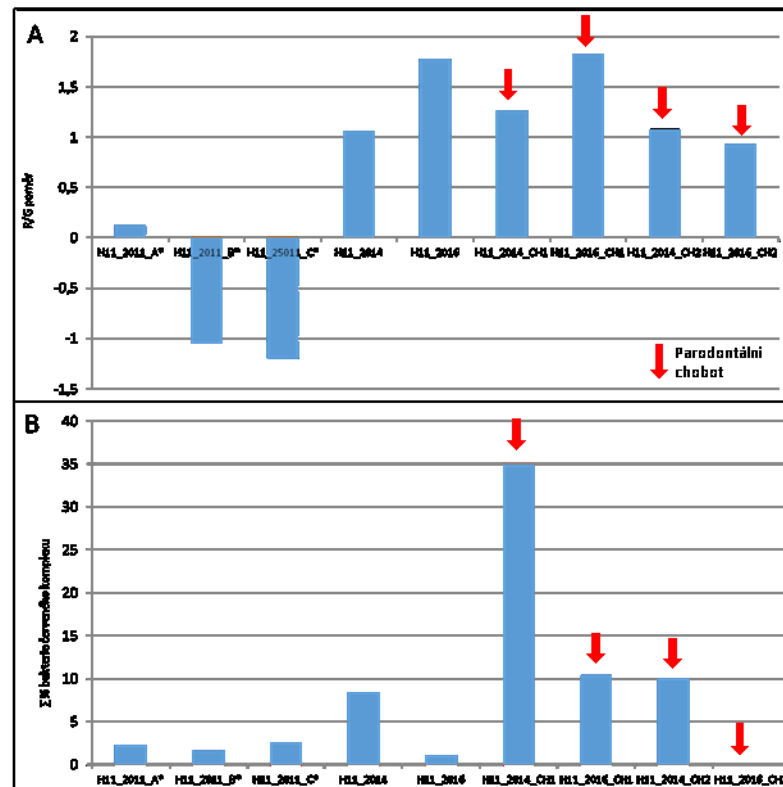
prováděném z tohoto chobotu o dva roky později. U této osoby se překvapivě vykytují pouze dvě bakterie červeného komplexu, a to *T. forsythia* a *T. denticola*, zatímco *P. gingivalis* chybí. Nicméně z obr. 11 jsou patrné i další taxony asociované s parodontitidou.



Obrázek 20 Porovnání R/G poměru (A) a množství bakterií červeného komplexu (B) u osoby H6 v průběhu dlouhodobé studie

Hodnoty R/G poměru osoby H11 (viz obr. 21) v roce zařazení do studie se pohybují od 0,13 do -1,2 ale již v těchto odběrech je patrné malé množství bakterií červeného komplexu (okolo 2 % celkové relativní abundance). V roce 2014 byly u této osoby identifikovány dva parodontální choboty, čemuž odpovídá nárůst hodnot R/G poměru a bakterií červeného komplexu. Ačkoliv lze u vzorků z roku 2016 sledovat snížení relativní abundance bakterií červeného komplexu, z grafu na obr. 12 je patrné výrazné zvýšení relativní abundance jiné bakterie asociované s parodontitidou, a to *P. endodontalis* (Abusleme a kol.

2013, Griffen a kol. 2012, Kirst a kol. 2015, Szafranski a kol. 2015). Detekce bakterií červeného komplexu 3 roky před diagnózou prvních klinických projevů parodontitidy (parodontálních chobotů) také podporuje teorii, že ke změně orálního mikrobiomu pravděpodobně dochází ještě dříve, než se samotné onemocnění projeví.



Obrázek 21 Porovnání R/G poměru (A) a množství bakterií červeného komplexu (B) u osoby H11 v průběhu dlouhodobé studie

Dalším cílem této práce bylo porovnání složení orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů a chronickou a agresivní parodontitidou. Při pohledu na složení orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob je z obr. 14 a 17 na první pohled patrná převaha taxonů spojených se zdravím oproti taxonům spojeným s parodontitidou a žádné nebo jen minimální množství bakterií červeného komplexu, což je v souladu s literaturou. Pouze u 5 osob je hodnota R/G poměru menší než -1, značící podle našich dosavadních výsledků dobré parodontální zdraví. U většiny osob (18 z 24) se hodnota R/G poměru pohybuje v rozmezí -1/+1. U těchto osob lze (podle našich předběžných výsledků)

předpokládat možné vyšší riziko budoucího vývoje parodontitidy a bude velmi zajímavé tuto teorii dále pozorovat při dlouhodobé studii. Ve skupině zdravých osob je patrná jedna výrazná výjimka, a to osoba H4. U této osoby lze ve vzorcích odebraných v letech 2014 a 2016 pozorovat vysoké hodnoty R/G poměru (cca 1,5 a 2) a také vysokou četnost bakterií červeného komplexu (okolo 30%), tedy hodnoty, které by jednoznačně odpovídaly rozvinuté parodontitidě. Tato osoba potvrzuje význam prevence a včasné diagnostiky, neboť se jedná o pracovníka ve stomatologii, u kterého je standardem vynikající úroveň dentální hygieny. Bakteriální biofilm, ačkoliv je velmi nepříznivého složení, je neustále precizně odstraňován, a tudíž nedochází k rozvoji masivní zánětlivé reakce, vzniku parodontálního chobotu a poškození alveolární kosti. Teorii, že dokonalá kontrola subgingiválního plaku může zastavit progresi parodontitidy na dlouhou dobu, podpořili ve své studii například Axelsson a kol.(2004).

Podobným příkladem může být i další ze skupiny parodontálně zdravých osob (H17), která vykazovala dlouhodobě poměrně nepříznivé složení orálního mikrobiomu (hodnoty R/G poměru v roce 2011 při zařazení do studie byly 0,5, 0,4, a 0,8). K razantnímu zlepšení došlo v posledním sledovaném období, kdy se hodnota R/G poměru 0,8 v roce 2014 snížila na -1,8 v roce 2016 a došlo k téměř naprosté eliminaci taxonů červeného komplexu oproti 10% v roce 2014. Toto zlepšení časově přesně odpovídá období kdy osoba H17 začala pravidelně navštěvovat dentální hygienu a celkově zintenzivnila dentální péči.

Osoby s chronickou parodontitidou nebyly sledovány průběžně, ale pouze na počátku studie a pak v této práci po 7 letech od prvních odběrů. Ze sedmi testovaných osob byly na počátku studie tři osoby zařazeny do výběrového souboru nejvíce postižených pacientů (CH4, CH10 a CH15), ostatní patřili mezi pacienty s mírnými klinickými příznaky onemocnění, kteří byli i na počátku studie svým R/G poměrem řazeni do „přechodové“ skupiny. Ve vzorcích z roku 2016 bylo možno pozorovat dva odlišné typy bakteriálních profilů. Tři osoby (CH1, CH 10, CH 15) z této skupiny vykazují typický profil odpovídající parodontitidě, tedy převahu taxonů asociovaných s parodontitidou, včetně dvou druhů bakterií červeného komplexu (*P. gingivalis* a *T. forsythia*) a nízkou relativní abundanci bakterií spojených s parodontálním zdravím. Pacienti CH10 i CH15 tedy vykazují i nadále velice nepříznivé složení mikrobiomu a nově se na stejnou úroveň zhoršil i stav osoby CH1, čemuž odpovídá i



zvýšení počtu postižených zubů z původních 3 na počátku studie na 9 v roce 2014. Naopak mikrobiální profil osoby CH4 se výrazně zlepšil stejně jako dalšího (ne tak postiženého) pacienta CH6. R/G poměry i suma abundancí taxonů červeného komplexu je řadí aktuálně do přechodové skupiny, stejně jako osoby CH7 a CH12, kteří si svůj status drží konstantní. Posouzení změny v taxonomickém složení mikrobiomu v souvislosti s rozvojem chronické parodontitidy nebylo cílem této práce, ani není součástí dlouhodobé studie (s ohledem na charakter onemocnění nebyla žádná výrazná změna očekávána), proto nejsou k dispozici kompletní anamnézy všech pacientů. Pro formulaci obecných závěrů se navíc jedná o příliš úzký soubor osob. Nicméně neočekávané dramatické zlepšení mikrobiálního profilu osoby CH4 nelze pominout. Osoba CH4 patřila v době zařazení do studie se svými 6 parodontálními choboty s hloubkou více než 6 mm do skupiny nejvíce postižených pacientů a tomu odpovídal i R/G poměr opakovaně přesahující hodnotu 2. Změna taxonomického složení mikrobiomu, který při odběru 2014 odpovídal parodontálně zdravé osobě, je tedy velice překvapivá. Dle dosavadních předpokladů je totiž poměrně obtížné zvrátit dysbiózu, pokud již v dutině ústní nastala. Individuální taxonomické složení mikrobiálního společenstva v dutině ústní je sice dynamické, nicméně dle našich předběžných výsledků i literárních údajů (Mira a kol. 2017) jde o dynamiku v rámci jednoho ze stabilních stavů (zdraví prospěšný „symbiotický“ mikrobiom, nebo dysbióza) a k nastartování změn je třeba poměrně silného vnějšího či vnitřního impulsu. Bohužel nemáme k dispozici aktuální informace o stavu ani průběhu léčby tohoto pacienta a proto by vyvozování jakýchkoli závěrů bylo vysoce spekulativní, nicméně skutečnost, že k takovému zvrátu může při vhodné léčbě a precizním dodržování orální hygieny dojít, je pro léčbu parodontitidy rozhodně povzbuzující.

Vzorky osob s agresivní parodontitidou podle očekávání vykazovaly nejvyšší četnost bakterií asociovaných s parodontitidou, včetně velkého množství bakterií červeného komplexu. Naopak taxony spojené s parodontálním zdravím se u těchto osob vyskytovaly jen velmi zřídka a v nízké relativní abundanci. Určitou výjimku představovaly osoby A14 a A18 (obě s lokalizovanou formou parodontitidy), u kterých bakterie červeného komplexu zahrnovaly pouze 0,5 a 1,5 % všech bakterií přítomných v daném vzorku. U osoby A 14 je navíc, oproti ostatním vzorkům této skupiny, patrná vyšší četnost bakterií asociovaných s parodontálním zdravím. Ačkoliv bakterie červeného komplexu u těchto vzorků nebyly příliš četné, onemocnění dokládá nález jiných bakterií asociovaných s parodontitidou, jako

například *F. nucleatum*, *P. endodontalis* či *P. intermedia*. S agresivní parodontitidou, zejména s její lokalizovanou formou bývá v literatuře často spojována bakterie *A.*

*actinomycetemcomitans*, konkrétně specifický klon JP2 (Brogan a kol. 1994, Könönen a Müller 2014). *A. actinomycetemcomitans* je jako jeden z parodontálních patogenů vyšetřován i komerčně dodávanými soupravami StomaGene<sup>®</sup>, ParoCheck<sup>®</sup> či MicroIDent<sup>®</sup> a spolu s *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* a *P. intermedia* je dokonce výrobcí komerčních souprav pro molekulární diagnostiku řazen mezi 5 nevýznamnějších paropatogenů. Ve sledované skupině pacientů s agresivní formou parodontitidy byl přitom *A. actinomycetemcomitans* detekován pouze u osoby A14, kde tato bakterie tvořila 3,6 % všech zastoupených taxonů, u ostatních vzorků byly hodnoty 0 nebo menší než 0,1 %. Na námi sekvenovaném úseku a na úrovni identity 98,5 % však nelze rozlišit, zda se jedná právě o specifický klon JP2. Z předběžných výsledků laboratoře ani z výsledků této diplomové práce není zřejmá asociace *A. actinomycetemcomitans* s parodontitidou, jeho výskyt ve vzorcích je ve všech skupinách zanedbatelný. Z dosud dostupné literatury vyplývá, že kromě *A. actinomycetemcomitans* JP2, nejsou mezi agresivní a chronickou formou parodontitidy pravděpodobně žádné kvalitativní rozdíly v bakteriálním složení orálního mikrobiomu, a s agresivní parodontitidou, stejně jako s chronickou, jsou spojeny především bakterie červeného a oranžového komplexu (Socransky a kol. 1998, Könönen a Müller 2014, Van der Velden 2017). Z obr. 17 vyplývá častější výskyt dosud nepřirazených taxonů *F. fastidiosum*, *M. buccale*, *Bacteroidetes [G-6]* či *Lachnospiraceae [G-8]* u pacientů s agresivní formou parodontitidy, ovšem pro potvrzení asociace těchto taxonů právě s agresivní parodontitidou bude nutná rozsáhlejší analýza širšího souboru pacientů.

Soubor ChP v této práci zahrnuje pouze 7 osob, z nichž 4 vykazují spíše mírnější příznaky onemocnění a mikrobiom odpovídající osobám v přechodovém stadiu. Uvažujeme-li ovšem pouze tři ChP osoby s nejvýraznějšími známkami onemocnění (tj. ChP 1,10 a 15 s 9, 20 a 6 postiženými zuby), pak se taxonomické složení mikrobiomu neliší od toho u pacientů s AP. Také NMDS analýza vycházející z Bray-Curtis indexů ekologických vzdáleností mezi jednotlivými vzorky jednoznačně řadila tyto osoby do jednoho klastru. Porovnáme-li ovšem zastoupení taxonů červeného komplexu ve vzorcích skupiny AP a vzorcích celého souboru chronických pacientů z počátku dlouhodobé studie (předběžné výsledky poskytnuté kolegyní Lenkou Sabovou), pak je zřejmé, že u pacientů s agresivní formou parodontitidy je výrazně

vyšší suma relativních abundancí taxonů červeného komplexu, především pak *P. gingivalis* a o něco méně *T. denticola*. Jiný rozdíl vysvětlující rychlejší nástup a progresi onemocnění nebyl z hlediska mikrobiologie identifikován.

Nejčetněji se vyskytující bakterií u všech tří skupin osob, tedy těch parodontálně zdravých i těch s chronickou či agresivní parodontitidou je *F. nucleatum*, což je v souladu s literaturou (Kolebrander a kol. 2006, Signat a kol. 2011). Tato bakterie se vyskytuje u všech analyzovaných vzorků s výjimkou vzorku osoby H2 odebraného v roce 2012. U této osoby nejsou ve vzorku odebraném v roce 2012 patrné žádné bakterie asociované s parodontitidou a hodnota R/G poměru je cca -5, což dle našich dosavadních výsledků značí velmi dobré parodontální zdraví. Postupně však i u této osoby narůstá četnost *F. nucleatum* i bakterií asociovaných s parodontitidou. Při sledování vývoje orálního mikrobiomu osoby H5 je dobře patrný postupný nárůst četnosti této bakterie, kdy v roce 2012 tvořila necelá 3 % všech bakterií přítomných ve vzorku, o dva roky později téměř 7 % a v roce 2016, kdy byl u této osoby identifikován parodontální chobot, již kolem 40 % všech přítomných bakterií. Zvýšená četnost této bakterie je patrná také v parodontálních chobotech ostatních osob. Tyto údaje potvrzují úlohu *F. nucleatum* jako centrální složky zubního plaku a především druhu, který vytváří vhodné prostředí pro pozdější kolonizátory a tvoří určitý „most“ mezi bakteriemi spojovanými s parodontálním zdravím a parodontitidou (Kolebrander a kol. 2006). Díky těmto vlastnostem představuje zvýšená četnost *F. nucleatum* předpoklad pro kolonizaci parodontálními patogeny a tedy pro vznik a vývoj parodontitidy, a je autory často řazena mezi taxony asociované s parodontitidou (Kolebrander a kol. 2006, Griffen a kol. 2012, Kirst a kol. 2015, Szafranski a kol. 2015).

Tato diplomová práce potvrzuje odlišné složení orálního mikrobiomu u parodontálně zdravých osob a pacientů s parodontitidou, což dokazuje význam mikrobiologického vyšetření při diagnostice parodontitidy. Diagnostika parodontitidy se však v současné době opírá pouze o klinické a rentgenologické vyšetření a mikrobiologické testy se rutinně nepoužívají. Hlavní nevýhodou klinického a rentgenologického vyšetření je fakt, že odhaluje pouze již probíhající onemocnění a bohužel často až v pokročilé fázi, kdy již došlo k velké ztrátě parodontálních tkání a postižení alveolární kosti a pacient již pozoruje pozdní příznaky, jako je např. viklání zubů. Z dosavadních výsledků naší laboratoře i výsledů této diplomové

práce (viz osoby H5, H6 a H 11) se však zdá, že složení orálního mikrobiomu se mění již dlouho před prvními klinickými projevy onemocnění. Pokud se tato teorie v budoucnu potvrdí jako pravdivá, bude možné použít mikrobiologické vyšetření nejen při diagnostice parodontitidy, ale především v rámci screeningu osob se zvýšeným rizikem vzniku tohoto onemocnění. Včasná diagnostika parodontitidy, popř. určení možného rizika jejího vzniku může mít pro budoucí vývoj onemocnění obrovský význam, neboť (jak dokazuje osoba H4 či H17, ale i literatura (Axelsson a kol. 2004)) se zdá, že precizní dentální hygienou lze vývoj onemocnění (a potažmo možnou ztrátu chrupu) po dlouhou dobu odvrátit či možná dokonce zastavit, což snižuje vysoké náklady na léčbu tohoto onemocnění.

Na trhu je v současné době několik komerčně dodávaných testů založených na enzymatické a imunologické reakci či hybridizaci. Příkladem je test Micro-IDent<sup>®</sup>, který v odůvodněných případech hraje některé pojišťovny, a který umožňuje detekci 5 bakteriálních druhů. Paradoxem je, že jedním z těchto druhů je *A. actinomycetemcomitans*, který se podle aktuálních poznatků, jak bylo uvedeno výše, považuje za vedlejší složku rezidentní orální mikroflóry a za spíše příležitostného patogena (Könönen a Müller 2014), což dokládá nedostatečnost této metody pro praktické použití. Společným nedostatkem těchto metod však je zejména schopnost detekovat pouze omezené množství bakteriálních taxonů a také pouze kvalitativní, popř. semikvantitativní informace o těchto bakteriích. Pro správné posouzení stavu orálního mikrobiomu je však nutná informace o všech bakteriích obsažených v daném vzorku a také o jejich poměrném zastoupení, neboť i bakterie asociované s parodontitidou se mohou vyskytovat u parodontálně zdravých osob a naopak. Důležité je však jejich množství. Příkladem je bakterie *F. nucleatum*, která, jak již bylo řečeno, se vyskytuje prakticky u všech osob, ale až její zvýšená četnost může znamenat varovný signál a určité riziko budoucího vývoje onemocnění. Důkazem nutnosti celkového obrazu je například osoba H6, u které se sice nevyskytuje jeden z nejvýznamnějších parodontálních patogenů, *P. gingivalis*, ale lze u ní pozorovat řadu dalších bakterií asociovaných s parodontitidou, nebo také osoba H11, u které došlo v průběhu studie k poklesu bakterií červeného komplexu, ale zároveň se zvýšila četnost jiných významných parodontálních patogenů. Tento komplexní pohled na orální mikrobiom umožňují sekvenční metody. R/G poměr definovaný v rámci první fáze této dlouhodobé studie k jednoduchému popisu stavu orálního mikrobiomu má, zdá se, dobrou vypovídací hodnotu. Vysoké hodnoty tohoto koeficientu lze, podle předpokladu, sledovat zejména u

pacientů s parodontitidou a vzorků odebíraných z parodontálních chobotů původně parodontálně zdravých osob, u kterých došlo k rozvoji onemocnění. U těchto osob byly navíc v posledním odběru (odběrech) provedeném před nálezem parodontálního chobotu (tj. 2 nebo 3 roky) hodnoty R/G poměru v rozmezí  $-1/+1$ , což odpovídá našemu předpokladu, že tyto hodnoty mohou znamenat jakýsi přechodný stav a potenciální zvýšené riziko vzniku parodontitidy. O použitelnosti tohoto poměru vypovídá také fakt, že se při shlukové (NMDS) analýze rozdělily nejenom podle zdravotního stavu, ale také právě podle tohoto koeficientu. U některých vzorků ze skupiny parodontálně zdravých osob byly patrné vyšší hodnoty R/G poměru, ačkoliv u těchto osob nebyly přítomny bakterie červeného komplexu. Pro možné klinické použití tohoto koeficientu by bylo pravděpodobně vhodné tyto bakterie ve výpočtu nějakým způsobem zvýraznit, či tyto údaje uvádět jako další parametrem parodontálního zdraví, neboť byla potvrzena jejich úloha v tomto onemocnění. Pro možné použití R/G poměru v klinické praxi je nutné rozšířit spektrum bakteriálních taxonů, které lze jednoznačně přiřadit k parodontálnímu zdraví či naopak parodontitidě, neboť těchto taxonů je prozatím málo a v některých případech byl R/G kalkulován pouze z cca 35 % taxonů identifikovaných v daném vzorku. K tomuto účelu složí postupné rozšiřování souboru parodontálně zdravých osob a také doplnění o pacienty s agresivní formou onemocnění, což však již není předmětem této diplomové práce. Zcela jistě nejsou aktuálně definované skupiny taxonů přiřazených k parodontálnímu zdraví či parodontitidě definitivní, ovšem s ohledem na metodiku použitou pro definování těchto skupin lze předpokládat, že dojde pouze k jejich rozšíření o další taxony, ale nikoli ke kvalitativnímu posunu.

Samotné sekvenační metody, včetně následného vyhodnocování velkých souborů dat jsou v současné době pro klinické použití příliš komplikované. Nicméně po určité optimalizaci metodického postupu, včetně automatizace přípravy sekvenační knihovny a vyhodnocení získaných výsledků a včetně výběru vhodných jednoduchých koeficientů, které by soubor získaných sekvencí přiřadily k některému z klinicky definovaných stavů, by mohly představovat užitečný a levný nástroj pro charakterizaci orálního mikrobiomu. Avšak jak ukazuje například osoba H4, ani komplexní charakterizace orálního mikrobiomu včetně přiřazení identifikovaných taxonů k jednomu či druhému stavu není jednoznačným ukazatelem parodontálního zdraví. Taxonomické složení orálního mikrobiomu je v čase dynamické a tudíž nelze z jediného odběru činit jednoznačné závěry (Mira a kol. 2017).

Vznik a rozvoj onemocnění navíc závisí na celé řadě dalších faktorů (Hatem 2012, Genco a Borgnakke 2013). Nicméně jako indikace rizika vzniku parodontitidy je charakterizace orálního mikrobiomu vhodná, stejně tak jako pro monitorování průběhu léčby.

## 8. Souhrn

- Bylo potvrzeno, že výsledky získané sekvenčními metodami 454 pyrosekvenování a Illumina jsou srovnatelné, a že v rámci dlouhodobé studie lze na výsledky získané metodou 454 pyrosekvenování navázat metodou Illumina, aniž by došlo z důvodu změny sekvenační metody ke zkreslení výsledků.
- Byla vyhodnocena část dlouhodobé studie, jíž je tato diplomová práce součástí.
  - U třech osob původně parodontálně zdravých osob, u kterých došlo v průběhu studie ke vzniku parodontálního chobotu, byl uveden do souvislosti stav orálního mikrobiomu a vznik klinických příznaků. Z výsledků jednoznačně vyplývá, že ke změně složení orálního mikrobiomu dochází ještě před projevem klinických příznaků onemocnění.
  - Pravidelnou a precizní dentální hygienou lze i v případě velice nepříznivého složení orálního mikrobiomu nástup onemocnění oddálit či možná dokonce zastavit. Překvapivě bylo zjištěno, že i u již probíhajícího onemocnění pravděpodobně lze správnou léčbou a hygienou zvrátit dysbiózu a postup onemocnění tak zpomalit či zastavit a oddálit ztrátu chrupu.
- Agresivní parodontitida se vyznačuje zejména vysokou relativní abundancí *F. nucleatum*, bakterií červeného komplexu (*P. gingivalis*, *T. forsythia* a *T. denticola*) a velmi nízkou četností bakterií asociovaných s parodontálním zdravím.
- Nebyl pozorován významný rozdíl mezi složením orálního mikrobiomu u pacientů s chronickou a agresivní formou parodontitidy vysvětlující rychlejší nástup a progresi této formy onemocnění.
- Při zavedení vhodných parametrů (jako jsou například v této práci navrhované R/G poměr a suma bakterií červeného komplexu) mohou sekvenační metody sloužit jako vhodný nástroj pro odhalení rizika budoucího rozvoje onemocnění a také pro monitorování úspěšnosti léčby

## 9. Seznam použité literatury

1. Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, 7(5), 1016.
2. Albandar, J. M. (2002). Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 29(1), 177-206.
3. Albandar, J. M. (2005). Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dental Clinics*, 49(3), 517-532.
4. Albandar, J. M., Streckfus, C. F., Adesanya, M. R., & Winn, D. M. (2000). Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *Journal of periodontology*, 71(12), 1874-1881.
5. Amano, A. (2010). Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontology 2000*, 52(1), 12-37.
6. Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N., Hamada, N. (2004). Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of periodontal research*, 39(2), 136-142.
7. Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of periodontology*, 4(1), 1-6.
8. Armitage, G. C., Cullinan, M. P., Seymour, G. J. (2010). Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontology 2000*, 53(1), 7-11.
9. Axelsson, P., Nyström, B., a Lindhe, J. (2004). The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: results after 30 years of maintenance. *Journal of clinical periodontology*, 31(9), 749-757.
10. Boyer, B. P., Ryerson, C. C., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Genco, R. J., Snyder, B. (1996). Colonization by Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in adult periodontitis patients as detected by the antipody-based Evalusite Test. *Journal of clinical periodontology*, 23(5), 477-484.
11. Brissette, C. A., Lukehart, S. A. (2002). Treponema denticola is resistant to human  $\beta$ -defensins. *Infection and immunity*, 70(7), 3982-3984.
12. Brogan, J. M., Lally, E. T., Poulsen, K., Kilian, M., Demuth, D. R. (1994). Regulation of Actinobacillus actinomycetemcomitans leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infection and Immunity*, 62(2), 501-508.
13. Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, N. B., Deng, D. M., Laine, M. L., van Winkelhoff, A. J., Crielaard, W. (2010). The capsule of Porphyromonas gingivalis reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC microbiology*, 10(1), 5.
14. Castelino, M., Eyre, S., Moat, J., Fox, G., Martin, P., Ho, P., Upton, M., Barton, A (2017). Optimisation of methods for bacterial skin microbiome investigation: primer selection and comparison of the 454 versus MiSeq platform. *BMC microbiology*, 17(1), 23.



15. Clothier, B., Stringer, M., Jeffcoat, M. K. (2007). Periodontal disease and pregnancy outcomes: exposure, risk and intervention. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 21(3), 451-466.
16. Curtis, M. A., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M. (2001). Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12(3), 192-216.
17. Darveau, R. P., Belton, C. M., Reife, R. A., Lamont, R. J. (1998). Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, 66(4), 1660-1665.
18. Dashper, S. G., Seers, C. A., Tan, K. H., Reynolds, E. C. (2011). Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *Journal of dental research*, 90(6), 691-703.
19. De Filippis, F., Vannini, L., La Storia, A., Laghi, L., Piombino, P., Stellato, G., Lazzi, C. (2014). The same microbiota and a potentially discriminant metabolome in the saliva of omnivore, ovo-lacto-vegetarian and vegan individuals. *PLoS One*, 9(11), e112373.
20. D'Ercole, S., Catamo, G., Piccolomini, R. (2008). Diagnosis in periodontology: a further aid through microbiological tests. *Critical reviews in microbiology*, 34(1), 33-41.
21. Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5002-5017.
22. Dhalla, N., Patil, S., Chaubey, K. K., Narula, I. S. (2015). The detection of BANA micro-organisms in adult periodontitis before and after scaling and root planing by BANA-Enzymatic™ test kit: An in vivo study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(4), 401.
23. Dhotre, S. V., Davane, M. S. Nagoba, B. S. (2017). Periodontitis, bacteremia and infective endocarditis: A Review Study. *Arch Pediatr Infect Dis*, e41067.
24. Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 401-414.
25. Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2837-2848.
26. Dix, K., Watanabe, S. M., McArdle, S., Lee, D. I., Randolph, C., Moncla, B., Schwartz, D. E. (1990). Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 28(2), 319-323.
27. Dostálová a kol. (2008). *Stomatologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 193 s. ISBN 978-80-247-2700-4.
28. Dřížhal, I., Prouzová, K., a Úlehlová, J. (2012). Parodontitida–jak ji poznat a léčit. *Praktické lékařství*, 8(4), 164-166.
29. Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*, 13(2), 25-36.
30. Duran-Pinedo, A. E., Frias-Lopez, J. (2015). Beyond microbial community composition: functional activities of the oral microbiome in health and disease. *Microbes and infection*, 17(7), 505-516.
31. Duran-Pinedo, A. E., Chen, T., Teles, R., Starr, J. R., Wang, X., Krishnan, K., a Frias-Lopez, J. (2014). Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *The ISME journal*, 8(8), 1659.

32. Eick, S., Pfister, W. (2002). Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *Journal of clinical periodontology*, 29(7), 638-644.
33. Eley, B. M., Cox, S. W. (2003). Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*, 31(1), 105-124.
34. Engebretson, S., Chertog, R., Nichols, A., Hey-Hadavi, J., Celenti, R., Grbic, J. (2007). Plasma levels of tumour necrosis factor- $\alpha$  in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *Journal of clinical periodontology*, 34(1), 18-24.
35. Favari, M., Mayer, M. P. A., Feres, M., De Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E., Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral microbiology and immunology*, 23(2), 112-118.
36. Feng, Z., Weinberg, A. (2006). Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology 2000*, 40(1), 50-76.
37. Fenno, J. C., Müller, K. H., McBride, B. C. (1996). Sequence analysis, expression, and binding activity of recombinant major outer sheath protein (Msp) of *Treponema denticola*. *Journal of bacteriology*, 178(9), 2489-2497.
38. Fenno, J. C., Tamura, M., Hannam, P. M., Wong, G. W., Chan, R. A., McBride, B. C. (2000). Identification of a *Treponema denticola* OppA homologue that binds host proteins present in the subgingival environment. *Infection and immunity*, 68(4), 1884-1892.
39. Genco, R. J., Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 62(1), 59-94.
40. Gonçalves, P. F., Harris, T. H., Elmariah, T., Aukhil, I., Wallace, M. R., Shaddox, L. M. (2017). Genetic polymorphisms and periodontal disease in populations of African descent: A review. *Journal of periodontal research*. 53(2), 164-173.
41. Graves, D. T., Jiang, Y., Genco, C. (2000). Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Current opinion in infectious diseases*, 13(3), 227-232.
42. Gray, M. W., Sankoff, D., Cedergren, R. J. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 12(14), 5837-5852.
43. Grenier, D. (1992). Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, 60(12), 5298-5301.
44. Griffen, A. L., Beall, C. J., Campbell, J. H., Firestone, N. D., Kumar, P. S., Yang, Z. K., Podar, M., Leys, E. J. (2012). Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME journal*, 6(6), 1176.
45. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5(1), 78-111.
46. Hajishengallis, G., Martin, M., Sojar, H. T., Sharma, A., Schifferle, R. E., DeNardin, E., Russell M., W., Genco, R. J. (2002). Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(2), 403-411.
47. Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4), 9.

48. Hasebe, A., Yoshimura, A., Into, T., Kataoka, H., Tanaka, S., Arakawa, S., Ishikura, H., Golenbock, D. T., Sugaya, T., Tsuchida, N., Kawanami, M., Hara, Y., Kawanami, M. (2004). Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infection and immunity*, 72(3), 1318-1325.
49. Hatem, A. E. (2012). Epidemiology and risk factors of periodontal disease. In *Periodontal Diseases-A Clinician's Guide*. InTech.
50. Heasman, L., Stacey, F., Preshaw, P. M., McCracken, G. I., Hepburn, S., Heasman, P. A. (2006). The effect of smoking on periodontal treatment response: a review of clinical evidence. *Journal of clinical periodontology*, 33(4), 241-253.
51. Heitz- Mayfield, L. J. A. (2005). Disease progression: identification of high- risk groups and individuals for periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 32(6), 196-209.
52. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*, 54(1), 11-26.
53. How, K. Y., Song, K. P., Chan, K. G. (2016). Porphyromonas gingivalis: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Frontiers in microbiology*, 7, 53.
54. Hujuel, P. P., a Lingström, P. (2017). Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review. *Journal of clinical periodontology*, 44(S18).
55. Huttner, E. A., Machado, D. C., De Oliveira, R. B., Antunes, A. G. F., Hebling, E. (2009). Effects of human aging on periodontal tissues. *Special Care in Dentistry*, 29(4), 149-155.
56. Chi, B., Qi, M., Kuramitsu, H. K. (2003). Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Research in microbiology*, 154(9), 637-643.
57. Imamura, T., Travis, J., Potempa, J. (2003). The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Current Protein and Peptide Science*, 4(6), 443-450.
58. Indugu, N., Bittinger, K., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Pitta, D. (2016). A comparison of rumen microbial profiles in dairy cows as retrieved by 454 Roche and Ion Torrent (PGM) sequencing platforms. *PeerJ*, 4, e1599
59. Ishihara, K. (2010). Virulence factors of *Treponema denticola*. *Periodontology 2000*, 54(1), 117-135.
60. Jackson, D. A. (1995). PROTEST: a PROcrustean randomization TEST of community environment concordance. *Ecoscience*, 2(3), 297-303.
61. Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., Whiteley, M. (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5(2), e01012-14.
62. Karimbux, N. Y., Saraiya, V. M., Elangovan, S., Allareddy, V., Kinnunen, T., Kornman, K. S., Duff, G. W. (2012). Interleukin- 1 Gene Polymorphisms and Chronic Periodontitis in Adult Whites: A Systematic Review and Meta- Analysis. *Journal of periodontology*, 83(11), 1407-1419.
63. Kesavalu, L., Sathishkumar, S., Bakthavatchalu, V., Matthews, C., Dawson, D., Steffen, M., Ebersole, J. L. (2007). Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infection and immunity*, 75(4), 1704-1712.
64. Kiecolt-Glaser, J. K., Preacher, K. J., MacCallum, R. C., Atkinson, C., Malarkey, W. B., Glaser, R. (2003). Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 100(15), 9090-9095

65. Kim, M., Morrison, M., & Yu, Z. (2011). Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of microbiological methods*, 84(1), 81-87.
66. Kinane, D. F., & Hart, T. C. (2003). Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(6), 430-449.
67. Kirst, M. E., Li, E. C., Alfant, B., Chi, Y. Y., Walker, C., Magnusson, I., Wang, G. P. (2015). Dysbiosis and alterations in predicted functions of the subgingival microbiome in chronic periodontitis. *Applied and environmental microbiology*, 81(2), 783-793.
68. Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, 42(1), 47-79.
69. Könönen, E., Müller, H. P. (2014). Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 65(1), 46-78.
70. Korte, D. L., Kinney, J. (2016). Personalized medicine: an update of salivary biomarkers for periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 70(1), 26-37.
71. Kriebel, K., Hieke, C., Müller-Hilke, B., Nakata, M., Kreikemeyer, B. (2018). Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease—Connection of Periodontitis and Rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. *Frontiers in microbiology*, 9, 53.
72. Kumar, P. S., Griffen, A. L., Moeschberger, M. L., Leys, E. J. (2005). Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 3944-3955.
73. Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.
74. Larsen, T., Fiehn, N. E. (2017). Dental biofilm infections—an update. *APMIS*, 125(4), 376-384.
75. Li, Y., He, J., He, Z., Zhou, Y., Yuan, M., Xu, X., Sun, F., Liu, Ch., Xie, W., Deng, Y a kol. (2014). Phylogenetic and functional gene structure shifts of the oral microbiomes in periodontitis patients. *The ISME journal*, 8(9), 1879–1891.
76. Limeback, H. a kol. (2017) *Preventivní stomatologie*. Přeložila Kaiferová J., Broukal, Z., Praha: Grada Publishing, ISBN 978-80-271-0094-1.
77. Liu, R., Desta, T., Raptis, M., Darveau, R. P., Graves, D. T. (2008). P. gingivalis and E. coli lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *Journal of periodontology*, 79(7), 1241-1247.
78. Loesche, W. J. (1992). DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *Journal of periodontology*, 63(12), 1102-1109.
79. Loesche, W. J., Bretz, W. A., Kerschensteiner, D., Stoll, J., Socransky, S. S., Hujoel, P., Lopatin, D. E. (1990). Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *Journal of clinical microbiology*, 28(7), 1551-1559.
80. Margulies, M. M., Egholm, W. E., Altman, S., Attiya, J. S., Bader, L. A., Bemben, J., Berka, M. S., Braverman, Y. J., Chen, Z. T., Chen, S. B. a kol. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376.
81. Marsh, P. D., Zaura, E. (2017). Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology*, 44(18), 12-22.

82. Mealey, B. L., Oates, T. W. (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology*, 77(8), 1289-1303.
83. Mira, A., Simon- Soro, A., Curtis, M. A. (2017). Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *Journal of clinical periodontology*, 44(18), 23-38.
84. Miyamoto, M., Ishihara, K., Okuda, K. (2006). The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. *Infection and immunity*, 74(4), 2462-2467.
85. Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A., Ranney, R. R. (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infection and Immunity*, 38(3), 1137-1148.
86. Mozorova, J. (2016). Zánětlivé parodontopatie. *Praktické lékařství*. 12(2): 58-61.
87. Mutschelknauss R. E. a kol (2002). Praktická parodontologie: klinické postupy. 1. vyd. Praha: Quintessenz, 532 s. ISBN 80-902118-8-7.
88. Najeeb, S., Zafar, M. S., Khurshid, Z., Zohaib, S., Almas, K. (2016). The role of nutrition in periodontal health: an update. *Nutrients*, 8(9), 530.
89. Nath, S. G., Raveendran, R. (2011). "What is there in a name?": A literature review on chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(4), 318-322.
90. Neiva, R. F., Steigenga, J., Al- Shammari, K. F., Wang, H. L. (2003). Effects of specific nutrients on periodontal disease onset, progression and treatment. *Journal of clinical periodontology*, 30(7), 579-589.
91. Nibali, L., Donos, N., & Henderson, B. (2009). Periodontal infectogenomics. *Journal of medical microbiology*, 58(10), 1269-1274.
92. Pantůčková, P., Bartošová, M., Broukal, Z., Kukletová, M., Hollá, L. I. (2016). Detection of selected periodontal bacteria in preschool children affected by early childhood caries. *Folia microbiologica*, 61(6), 533-538.
93. Paster, B. J., Dewhirst, F. E. (2009). Molecular microbial diagnosis. *Periodontology 2000*, 51(1), 38-44.
94. Paster, B. J., Boches, S. K., Galvin, J. L., Ericson, R. E., Lau, C. N., Levanos, V. A., Sahasrabudhe A., Dewhirst, F. E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3770-3783.
95. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42(1), 80-87.
96. Poskerová, H., Bořilová, P. L., Vokurka, J., Fassmann, A., Izakovičová, L. H. (2014). Diabetes mellitus a orální zdraví. *Česká Stomatologie* 114(5). 75-86.
97. Razzouk, S. (2016). Regulatory elements and genetic variations in periodontal diseases. *Archives of oral biology*, 72, 106-115.
98. Rescala, B., Rosalem Jr, W., Teles, R. P., Fischer, R. G., Haffajee, A. D., Socransky, S. S. Gustaffson, A., Figueredo, C. M. (2010). Immunologic and microbiologic profiles of chronic and aggressive periodontitis subjects. *Journal of periodontology*, 81(9), 1308-1316.
99. Riep, B., Edesi-Neuß, L., Claessen, F., Skarabis, H., Ehmke, B., Flemmig, T. F., Bernimoulin, J., Göbel, U., Møter, A. (2009). Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *Journal of clinical microbiology*, 47(6), 1705-1711.

100. Ritchie, C. S., Kinane, D. F. (2003). Nutrition, inflammation, and periodontal disease. *Nutrition*, 19(5), 475-476.
101. Sakakibara, J., Nagano, K., Murakami, Y., Higuchi, N., Nakamura, H., Shimozaoto, K., a Yoshimura, F. (2007). Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology*, 153(3), 866-876.
102. Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., Silva, A. (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of clinical periodontology*, 31(12), 1034-1047.
103. Saremi, A., Nelson, R. G., Tulloch-Reid, M., Hanson, R. L., Sievers, M. L., Taylor, G. W., Shlossman, M., Bennett, P. H., Genco, R., Knowler, W. C. (2005). Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes care*, 28(1), 27-32.
104. Sharma, A. (2010). Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontology 2000*, 54(1), 106-116.
105. Sharma, A., Sojar, H. T., Glurich, I., Honma, K., Kuramitsu, H. K., Genco, R. J. (1998). Cloning, expression, and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. *Infection and immunity*, 66(12), 5703-5710.
106. Shearer, D. M., Thomson, W. M., Caspi, A., Moffitt, T. E., Broadbent, J. M., Poulton, R. (2011). Inter-generational continuity in periodontal health: findings from the Dunedin Family History Study. *Journal of clinical periodontology*, 38(4), 301-309.
107. Signat, B., Roques, C., Poulet, P., a Duffaut, D. (2011). Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol*, 13(2), 25-36
108. Simón-Soro, A., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., Mira, A. (2013). Microbial geography of the oral cavity. *Journal of dental research*, 92(7), 616-621.
109. Slezák, R. (1995). *Praktická parodontologie*. Praha: Quintessenz, 148 s. ISBN 80-901024-8-4.
110. Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*, 38(1), 135-187.
111. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134-144.
112. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Smith, G. L. F., Dzink, J. L. (1987). Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *Journal of clinical Periodontology*, 14(10), 588-593.
113. Stein J. M., Jervøe-Storm P. M. (2011). Antinfekční terapie parodontitis. *Quintessenz – Parodontologie*, 12.
114. Szafranski, S. P., Wos-Oxley, M. L., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Plumeier, I., Klawonn, F., Tomascch, J., Meisinger, C., Kühnisch, J., Szajer, H., Wagner-Döbler I., Pieper, D. H. (2015). High-resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis. *Applied and environmental microbiology*, 81(3), 1047-1058.
115. Škach, M. a kol. (1984). *Základy parodontologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 224 s.

116. Tanner, A., Maiden, M. F. J., Macuch, P. J., Murray, L. L., Kent, R. L. (1998). Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 85-98.
117. Team, R. (2015). RStudio: integrated development for R. *RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>*, 42.
118. Teles, R., Teles, F., Frias- Lopez, J., Paster, B., a Haffajee, A. (2013). Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontology 2000*, 62(1), 95-162.
119. Tomás, I., Regueira-Iglesias, A., López, M., Arias-Bujanda, N., Novoa, L., Balsa-Castro, C., Tomás, M. (2017). Quantification by qPCR of Pathobionts in Chronic Periodontitis: Development of Predictive Models of Disease Severity at Site-Specific Level. *Frontiers in microbiology*, 8, 1443.
120. Tunkel, J., Heinecke, A., & Flemmig, T. F. (2002). A systematic review of efficacy of machine- driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 72-81.
121. Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338.
122. Van der Velden, U. (2017). What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? *Periodontology 2000*, 75(1), 24-44.
123. Vartoukian, S. R., Palmer, R. M., Wade, W. G. (2009). Diversity and morphology of members of the phylum “Synergistetes” in periodontal health and disease. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3777-3786.
124. Větrovský, T., Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, 8(2), e57923.
125. Větrovský, T., Baldrian, P., Morais, D., Berger, B. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, 1, 3.
126. Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research*, 69(1), 137-143.
127. Washizu, M., Ishihara, K., Honma, K., Okuda, K. (2003). Effects of a mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* on abscess formation and immune responses in mice. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 44(3), 141-147.
128. Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.
129. Ximenez- Fyvie, L. A., Almaguer- Flores, A., Jacobo- Soto, V., Lara- Cordoba, M., Moreno- Borjas, J. Y., Alcantara- Maruri, E. (2006). Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 33(12), 869-877.
130. Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A., Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and environmental microbiology*, 75(16), 5227-5236.
131. Zijngje, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R., a Harmsen, H. J. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*, 5(2), e9321.
132. Zong, G., Holtfreter, B., Scott, A. E., Völzke, H., Petersmann, A., Dietrich, T., Newson, R. S., Kocher, T. (2016). Serum vitamin B12 is inversely associated with periodontal progression and risk of tooth loss: a prospective cohort study. *Journal of clinical periodontology*, 43(1), 2-9.