

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Doktorský (Ph.D.)
Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. Jaroslav Myšák

Parodontální patogeny a systémové markery v etiologii a diagnostice onemocnění parodontu a kardiovaskulárního systému

Periopathogens and systemic markers in etiology and diagnostics of periodontal and cardiovascular diseases

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc.
prof. MUDr. et MUDr. René Foltán, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracoval samostatně za použití podkladů a materiálů uvedených v seznamu (§ 31 Autorského zákona č. 121/2000 Sb.). Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobností kvalifikačních prací.

Studie byla podporována z výzkumných projektů SVV UK-P28/LF1/6 a Progres Q29 Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky a byla schválena Etickou komisí 1. LF UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze dne 5. 7. 2011.

DNA diagnostika orálního mikrobiomu

Studie týkající se DNA diagnostiky orálního mikrobiomu pomocí metody pyrosekvenování z biologického materiálu – aortálních a mitrálních chlopní, ze vzorků odebraných z parodontálních chobotů, proběhla díky institucionální podpoře P28/LF1/6 ve spolupráci Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha, Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky a II. chirurgické kliniky kardiovaskulární chirurgie 1. LF UK a VFN Praha.

Jaroslav Myšák

Identifikační záznam:

MYŠÁK, JAROSLAV. *Parodontální patogeny a systémové markery v etiologii a diagnostice onemocnění parodontu a kardiovaskulárního systému. [Periopathogens and systemic markers in etiology and diagnostics of periodontal and cardiovascular diseases]*. Praha, 2019. Počet stran 131, počet příloh 0. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN 2019. Školitel. Mazánek Jiří, Foltán René.

Poděkování

Na tomto místě bych rád vyjádřil velké poděkování a uznání mým školitelům prof. MUDr. Jiřímu Mazánkovi, DrSc. (2010-2017) a prof. MUDr. et MUDr. René Foltánovi, Ph.D. (2017-2018) za odborné vedení v průběhu Ph.D. studia.

Dále bych chtěl velmi poděkovat proděkance prof. MUDr. Janě Duškové, DrSc., MBA za odborné vedení během celého postgraduálního studia, za vstřícnost a odbornou pomoc při vypracování mé disertační práce.

Děkuji také prof. MUDr. Zdeňku Broukalovi, DrSc. a odb. as. MUDr. Ladislavu Korábkovi, CSc., MBA za velmi cenné připomínky a odborné vedení v rámci řešení výzkumného projektu a celého postgraduálního studia.

Poděkování také patří Mgr. Taťáně Janatové ze Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha a Ing. Jiřímu Janatovi, CSc. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za odborné konzultace a možnost zpracování vzorků metodou pyrosekvenování s následným vyhodnocením výsledků. Dále bych velice rád poděkoval Mgr. Lence Sabové z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za kompletní sekvenování bakteriální DNA, vyhodnocení výsledků a jejich grafické zpracování.

Velké poděkování též patří Mgr. Lucii Najmanové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky za odborné konzultace během celého postgraduálního studia a též během zpracování disertační práce.

Abstrakt

Parodontitis je primárně onemocnění postihující závěsný aparát zubu, a tudíž týkající se dutiny ústní, ovšem její souvislost s řadou systémových onemocnění je dnes zjevná. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, v jehož etiologii hrají významnou roli orální mikroorganismy a jejich interakce s imunitním systémem hostitele. Díky prudkému rozvoji DNA diagnostických metod v posledních cca. 15 letech došlo k významnému rozšíření spektra identifikovaných orálních mikroorganismů a zároveň byly značně zpřesněny představy o přiřazení konkrétních taxonů k parodontálnímu zdraví či nemoci. Sekvenační metody také přinášejí nové možnosti ve studiu vztahu parodontitis s onemocněními jako jsou např. diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, CMP, plicní infekce, onemocnění ledvin aj.

Předkládaná práce je zaměřena na využití sekvenačních metod pro porovnání taxonomického složení mikrobiálního společenstva dutiny ústní a tkání aortální chlopně u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (KVO) a rozvinutou chronickou parodontitis. Pro charakterizaci taxonomického složení mikrobiomu ze studovaných tkání byla využita metoda 454 pyrosekvenování variabilního úseku IV-V bakteriální 16S rDNA. Přítomné taxony byly určeny na základě porovnání získaných sekvencí s databází HOMD (Human Oral Microbiome Database).

Společnou charakteristikou KVO a parodontitis je vznik zánětu. Nejintenzivněji je v této souvislosti studována korelace zánětlivého markeru C reaktivního proteinu (CRP). Hodnotu CRP stanovenou vysoce senzitivní metodou (hsCRP) přitom American Heart Association považuje za významný ukazatel, který může nemocného bez manifestního KVO zařadit do skupiny s vysokým kardiovaskulárním rizikem, aniž by byly přítomny klasické rizikové faktory. Dalším cílem předkládané práce tedy bylo stanovení CRP z kapilární krve u pacientů s různou mírou postižení parodontu a posouzení rizika vzniku KVO v závislosti na závažnosti parodontálního onemocnění.

Propojení výsledků laboratorní a klinické fáze studie by mělo vést k hlubšímu porozumění vztahů mezi parodontálními patogeny na jedné straně a iniciací i progresí aterosklerotických změn na straně druhé. Ve výsledku by pak mělo vést ke zkvalitnění péče o pacienty s parodontitis i s kardiovaskulárními onemocněními.

Abstract

Periodontitis is a disease primarily affecting tooth attachment, i.e. concerning oral cavity, however, its connection to a number of systemic diseases is apparent nowadays. Oral microorganisms and their interaction with the immune system of their host play a significant part in the etiology of this multifactorial disease. Rapid development of DNA-based diagnostic methods in the last 15 years dramatically increased the spectrum of identified oral microorganisms and promoted understanding of how particular taxons correlate with periodontal health or disease. Moreover, next generation sequencing methods also bring new possibilities to study the relationship between periodontitis and other diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases (CVD), stroke, lung infection or kidney diseases, etc.

The presented work focuses on the use of sequencing methods to compare the taxonomic composition of microbiomes within oral cavity and the tissues of aortic valves in patients suffering from CVD. The characterisation of taxonomic composition of microbiome in the analysed tissues was performed using the method of 454 pyrosequencing of variable region IV-V of the bacterial 16S rDNA. The present taxons were determined by comparing the obtained sequences with the Human Oral Microbiome Database.

The common characteristic of both CVD and periodontitis is the development of inflammation. Intensive studies are being conducted on the correlation between periodontitis and inflammatory marker of C reactive protein (CRP). The American Heart Association considers CRP value determined using high sensitivity method (hsCRP) to be an important indicator which can classify a patient without any manifest CVD to a group with high cardiovascular risk, even in the absence of classic risk factors. Another objective of the presented work was the determination of CRP from capillary blood in patients with various extent of periodontal disease and assessment of the risk of developing CVD based on the extent of periodontal disease.

Interconnecting the results of laboratory and clinical phase of study should lead to a deeper understanding of relationship between periodontal pathogens on one side and initiation and progression of atherosclerotic changes on the other side. In the end it should result in improving the quality of health care provided to patients suffering from periodontitis and CVD.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle studie	11
3. Kardiovaskulární onemocnění	12
3.1. Ateroskleróza	12
3.2. Hypotézy vzniku aterosklerózy	13
4. Parodontopatie	15
4.1. Gingivitis	15
4.2. Gingivální recesy	16
4.3. Parodontitis	17
5. Historie problematiky oportunní metastatické infekce dentálního původu	21
6. Bakterie osidlující tkáň parodontu	23
6.1. Red komplex	25
7. Bakteriémie ve vztahu k zubnímu ošetření	28
8. Aktivace přirozené imunity v dutině ústní a tkáních parodontu	29
8.1. Vliv proteáz a heat shock proteinů (HSP) z bakterií dentálního plaku	31
9. Parodontitis a systémová onemocnění	34
10. Parodontitis a kardiovaskulární onemocnění	35
10.1. Aterogeneze ovlivněná mediátory zánětu vzniklými reakcí na antigeny z dentálního plaku	38
10.2. Parodontitis a systémové markery	39
10.3. C reaktivní protein	40
11. Detekce bakteriální DNA z tkáň srdeční chlopně metodou pyrosekvenování ..	42
12. Experimentální část I	43
13. Experimentální část II	48
14. Experimentální část III	51
15. Výsledky Experimentální části I	54
16. Výsledky Experimentální části II	69
17. Výsledky Experimentální části III	74
18. Diskuse	87
19. Závěr	102
20. Literatura	104

Seznam použitých zkratek

ADA	Americká asociace zubních lékařů (American Dental association)
AAP	Americká parodontologická společnost (American Academy of Periodontology)
BOP	Krvácení po sondáži (Bleeding on probing)
CAL	Ztráta klinického úponu (Clinical attachment loss)
CON	Kontrolní skupina v experimentální části III
CPI	Parodontologický index (Community periodontal index)
CRP	C reaktivní protein
DM	Diabetes mellitus
EKG	Elektrokardiogram
GEN	Skupina pacientů s generalizovanou formou agresivní parodontitis v experimentální části III
hCAP18	Humánní cathelicidin (antimikrobiální protein)
IL-6	Interleukin 6
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LBP	Lipopolysacharidy vážící protein
LDL-C	Cholesterol v lipoproteinu o nízké hustotě (low density lipoprotein cholesterol)
LOC	Skupina pacientů s lokalizovanou formou agresivní parodontitis v experimentální části III
LPS	Lipopolysacharidy
OPG	Orthopantomogram
PBI	Index krvácení papily (Papilla bleeding index)
PD	Hloubka sondáže parodontálního chobotu (Pocket depth)
s-PLA2	Sekreční fosfolipasa A2
Th	T pomocné buňky
TLRs	Toll like receptory
TNF- α	Tumor necrosis faktor α
T-RFLP	Polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organisation)

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou obecně považována za jednu z nejčastějších příčin úmrtí. V České republice umírá na KVO přibližně 100 tisíc lidí ročně. Mezi rizikové faktory patří poruchy metabolismu lipidů (hlavní rizikový faktor aterogeneze), dále vysoký krevní tlak, kouření, diabetes mellitus (DM) především II. typu, mužské pohlaví, věk, stres a mnoho dalších. Nověji jsou v etiopatogenezi aterosklerózy uvažovány i mikroorganismy, zejména mikrobiální flóra střeva a dutiny ústní [Koren et al., 2011]. Existují epidemiologické důkazy, že parodontitis přináší zvýšené riziko pro budoucí KVO [Tonetti et al., 2009]. Přesné mechanismy však nejsou doposud objasněny a probíhající výzkumy se orientují převážně na studium vlivu jednotlivých faktorů in vitro. Bakterie osidlující tělesné povrchy i dutiny některých lidských orgánů vytvářejí společně s tělními buňkami funkční orgán, který je také označován jako „superorganismus“ neboli holobiont [Kilian et al., 2016]. Vztahy mezi mikroorganismy a tělními buňkami jsou velmi rozmanité a zahrnují symbiózu, komenzalismus či dokonce parazitismus. Na charakteru těchto vztahů víceméně závisí zdravotní stav organismu. V současné době je popsáno kolem 700 bakteriálních druhů osidlujících různé povrchy dutiny ústní. Mezi ně patří patogenní i nepatogenní bakterie, které společně vytvářejí v dutině ústní rovnovážné prostředí. Při porušení této rovnováhy ve smyslu kladném či záporném, ve prospěch či neprospěch některých bakteriálních kmenů, může docházet k rozvoji onemocnění. Parodontální bakterie se jako součást orálního mikrobiomu podílejí na vzniku a progresi onemocnění parodontu – parodontopatii, mohou však invadovat i do buněk a tkání jiných orgánových systémů. Například *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* a *Fusobacterium nucleatum* byly detekovány v aterosklerotických plátech [Aimetti et al., 2007, Han et al., 2015]. Objevují se především v intercelulárních prostorech. Intracelulárně mohou invadovat do epiteliálních či endoteliálních buněk. Díky schopnosti adherence a invazivitě, což jsou základní mechanismy kolonizace, obrany těchto bakterií před imunitními mechanismy hostitele [Han et al., 2015] a diseminace do systémové cirkulace, jsou schopny stimulovat imunitní odpověď hostitelského organismu na lokální i systémové úrovni. Orální bakterie jsou tedy nejen hlavním etiologickým faktorem parodontitis, ale mohly by být i vedlejším rizikovým faktorem některých kardiovaskulárních

onemocnění, například aterosklerózy a infekční endokarditis. Otázkou je, jakými mechanismy a do jakých reakcí či fází by mohly tyto bakterie a jejich bakteriální endotoxiny v procesu aterogeneze zasahovat [Nguyen, 2015]. Bakterie díky svému imunogennímu potenciálu iniciují řadu imunologických reakcí jak ve tkáních parodontu, tak i ve tkáních kardiovaskulárního systému. Lokální i systémové imunitní reakce na bakteriální invazi lze obecně sledovat pomocí řady markerů: CRP, leukocyty, prokalcitonin, α 1 – kyselý glykoprotein (orosomukoid), fibrinogen, α 1 – antitrypsin, haptoglobin, C3 a C4 složky komplementu, ceruloplazmin aj. Především CRP je intenzivně studován v korelaci mezi parodontitis a KVO, jelikož elevace CRP je popisována v souvislosti s oběma onemocněními [Kalburgi et al., 2014].

CRP či další molekuly by se mohly uplatnit při monitoringu preklinických stavů, ale i sloužit jako kontrolní mechanismus při monitoringu onemocnění v průběhu remise onemocnění, jak u parodontitis, tak i KVO.

2. Cíle

Cílem této disertační práce je posoudit, zda by zánětlivé onemocnění parodontu (parodontitis) mohlo být jedním z vedlejších rizikových faktorů onemocnění kardiovaskulárního systému, a dále vyhodnotit využitelnost stanovení hladiny CRP pro posouzení rizika vzniku KVO u pacientů s parodontitis.

Jednotlivé dílčí kroky zahrnují:

- 1) Ustanovení souboru pacientů a kontrolního souboru
- 2) Charakterizace taxonomického složení mikrobiomu srdečních chlopní
- 3) Charakterizace taxonomického složení mikrobiomu parodontálního chobotu a jeho korelace s kompozicí mikrobiomu srdečních chlopní
- 4) Stanovení systémových hodnot CRP jako markeru zánětu a jeho korelace s klinicky zjištěnými parodontologickými parametry

3. Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění jsou v širším slova smyslu veškerá onemocnění srdce a cév; v užším slova smyslu se tento termín obvykle používá pro označení nemocí způsobených aterosklerotickými degenerativními změnami: ischemickou chorobu srdeční, ischemickou chorobu dolních končetin a ischemickou cévní mozkovou příhodu.

Rizikové faktory KVO můžeme rozdělit na neovlivnitelné (věk, pohlaví, genetické faktory, rodinná anamnéza) a ovlivnitelné (zejména zvýšená koncentrace LDL cholesterolu (LDL-C), arteriální hypertenze, kouření, DM a obezita). Mezi další „nové“ rizikové faktory patří C-reaktivní protein, interleukin 6, markery preklinické aterosklerózy (např. zvýšené kalciové skóre koronárních arterií), faktory ukazující změny hemokoagulační rovnováhy, např. fibrinogen, ukazatelé oxidačního stresu, nebo faktory metabolické, např. hladina homocysteinu či faktory spojené s metabolickým syndromem, jako jsou adipocytární hormony leptin a adiponektin [Žák et al., 2011]. Ukázalo se, že CRP se může podílet i na rozvoji, progresi a destabilizaci aterosklerotické léze, a dnes se předpokládá několik mechanismů aterogenního působení CRP. Tyto děje jsou regulovány řadou různých mechanismů, v nichž se uplatňují různé cytokiny. Bylo prokázáno, že CRP indukuje expresi adhezních molekul (CD 54, CD 106, E-selektinu) v lidských endoteliálních buňkách umbilikální žíly i v endoteliálních buňkách koronárních tepen [Pasceri et al., 2000].

3.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je degenerativní onemocnění tepen charakterizované místní akumulací lipidů a dalších komponent krve a fibrózní tkáně v intimě arterií provázené změnami v medii cévní stěny. Ateroskleróza se vyvíjí jako chronický zánět s nadměrnou zánětlivou odpovědí intimy a medie tepen na různé podněty, zejména na modifikované LDL (low density lipoproteins).

3.2. Hypotézy vzniku aterosklerózy

V 19. století vznikly dvě hypotézy vysvětlující vznik a vývoj aterosklerózy.

Rokitanského trombogenní (inkrustační) teorie považuje intimální pláty za následek organizace trombů a nahromadění lipidů za jev druhotný – z rozpadlých krevních buněk (Karel Rokitanský 1804-1878).

Virchowova lipidová (insudační) teorie předpokládá, že se lipidy dostávají do stěny tepny z krve z lumina, hromadí se v intimě a vedou ke vzniku plátů.

Dnešní pohled na patogenezi aterosklerózy spojuje obě hypotézy do teorie reakce na poškození a lze ji shrnout do čtyř bodů:

1. vznik ložisek chronického poškození endotelu s následnou poruchou jeho funkce, zejména zvýšenou permeabilitou
2. zvýšený průnik (insudace) lipoproteinů z plasmy do cévní stěny, jde hlavně o LDL s vysokým obsahem cholesterolu
3. buněčná reakce v místě poškození, jíž se účastní endotelie, krevní monocyty, trombocyty a hladké svalové buňky z intimy a medie
4. proliferace hladkých svalových buněk v intimě se vznikem vazivových plátů

Chronické nebo opakované poškození endotelu je nejdůležitějším spouštěcím momentem vzniku aterosklerózy. Jde nejčastěji o vlivy mechanické (poranění intimy), hemodynamické (hypertenze, účinek krevního proudu, např. turbulence v místech ohybů tepen a větvení), a vlivy součástí krevní plazmy (hypercholesterolemie, cirkulující vazoaktivní aminokyseliny, endotoxiny, imunokomplexy, chemické součásti cigaretového kouře, viry aj.). Pod vlivem chemotaktických látek z endotelií i lipidů se v intimě hromadí buňky, hlavně krevní monocyty (makrofágy) a trombocyty. Monocyty fagocytují část nahromaděných lipidových látek a mění se v pěnové buňky; tyto jsou podstatou nejčastějších aterogenních lézí – lipoidních skvrn.

Makrofágy, trombocyty a endotelie uvolňují různé růstové faktory, které vedou k migraci hladkých svalových buněk z medie do intimy a k jejich proliferaci. Buňky hladké svaloviny zde tvoří kolagen, elastin a proteoglykany – podstatu vlastního sklerotického plátu, a také fagocytují lipidy, takže spolu s krevními monocytami dávají vznik pěnovým buňkám.

Obsahuje-li plát méně lipidů, je tvořen převážně vazivem a je označován jako fibrózní plát. Při vyšším obsahu lipidů má plát v centru ložisko kašovitých

ateromových hmot bohatých cholesterolem a jeho estery. Takto vzniká ateromový plát. Na povrchu plátu bývá poškozen endotel a na takovém místě se tvoří trombus, hlavně z destiček a fibrinu. Jde-li o malý murální trombus, může být procesem organizace a reendotelizace zabudován do cévní stěny; opakování tohoto děje vede k růstu plátu. Tento mechanismus vysvětluje progresi aterosklerózy.

Původní klasické hypotézy o vývoji aterosklerózy nezahrnovaly zánět jako primární faktor patogeneze. Jedna z hypotéz předpokládala změny endotelu jako důsledek mechanického poškození s následnou kontaminací toxiny, ionty kovů, volnými radikály, které vedou k formaci aterosklerotických plátů [Mlynek et al., 2006, et al., 2004].

Další hypotéza zahrnovala ve vývoji aterosklerózy lipoproteiny nízké denzity, které jsou transportovány endotelem do intimy, kde jsou oxidovány a fungují jako chemoatraktant (monocytů) makrofágů, které následně tvoří pěnové buňky [Libby, 2009, Rufail, 2007]. Naopak Ross a Glomset [Ross a Glomset, 1973] a další předpokládali význam proliferace hladkého svalstva intimy. V posledním desetiletí bylo prokázáno, že ateroskleróza začíná jako zánětlivá reakce namířená proti endoteliálním buňkám a dalším složkám stěn arterií. V místě zánětu dochází k nahromadění makrofágů, T a B lymfocytů a mastocytů. Na stěnách krevních cév se dále usazují depozita tuků, což vede k uzavírání (okluzi) cév.

V průběhu posledních let došlo k nahromadění důkazů, které potvrzují asociaci mezi určitými bakteriemi a koronárním onemocněním, které se vyvíjí jako důsledek aterosklerózy. Tyto nálezy přinesly nový pohled na etiologii onemocnění.

4. Parodontopatie

4.1. Gingivitis

Mezi onemocnění gingivy zařazujeme řadu postižení různé etiologie a závažnosti. Jedná se zejména o zánětlivá a nezánětlivá postižení s akutním i chronickým průběhem, nedestruující alevolární kost a periodontium. Nejčastějším onemocněním gingivy je plakem podmíněná gingivitis (obrázek 1). Mezi další onemocnění gingivy patří gingivitis gravidarum, gingivitis (gingivostomatitis) ulcerosa, gingivostomatitis herpetica, gingivitis hyperplastica, gingivitis desquamativa aj.



Obrázek 1 – Plakem podmíněná gingivitis.

Obrázek ukazuje sytě červenou a krvácející gingivu s drobnými hyperplasiemi gingivy v oblasti interdentálních papil. Depozita plaku jsou patrna na zubních krčcích.

4.2. Gingivální recesy



Obrázek 2 – Generalizované gingivální recesy.

Obrázek ukazuje gingivální recesy, tzn. apikálně posunutý okraj marginální gingivy i attachmentu.

Jedná se o nezápětivé onemocnění parodontu projevující se apikálním posunem attachmentu (obrázek 2). V etiologii se uplatňují především faktory jako traumatická artikulace, sekundárně zánět gingivy, ortodontická léčba a z historického pohledu lze uvést i horizontální techniku čištění chrupu s použitím tvrdého zubního kartáčku. Tento faktor je dnes však redukován na minimum vzhledem k výrazné eliminaci tvrdých zubních pomůcek z prodeje. Gingivální recesy mohou být lokalizované nebo generalizované a mohou se vyskytovat na jednom či více zubních površích [Smith, 1997]. Některé typy gingiválních recesů se vyskytují bez současné přítomnosti zánětlivých onemocnění parodontu. Takové recesy jsou považovány za mukogingivální deformity a jsou zahrnuty do kategorie vývojových či získaných deformit a stavů dle Armitageovy klasifikace z roku 1999 [Armitage, 1999].

4.3. Parodontitis

V dospělé populaci je chronická parodontitis (obrázek 3) nejčastější příčinou ztráty zubů. Prevalence onemocnění je vysoká, mírná forma onemocnění postihuje 50 % dospělé populace, agresivní forma onemocnění zasahuje 5-15 % populace [Page, 1999].

Etiologie

Parodontitis je chronické zánětlivé onemocnění postihující závěsný aparát zubů – parodont. Původ a progresse zánětlivé reakce ve tkáních parodontu jsou výsledkem alterace souhry obranných mechanismů v parodontálních tkáních jako odpovědi na aktivitu bakterií dentálního plaku. Typickými klinickými znaky parodontitis jsou gingivitis, přítomnost pravého parodontálního chobotu a resorpce alveolární kosti patrná na rentgenovém snímku (obrázek 4). Pravý parodontální chobot vzniká ztrátou attachmentu v důsledku destrukce kolagenních vláken, resorpce alveolární kosti a apikálního posunu spojovacího epitelu. Dalším klinickým znakem je případně viklavost zubu. Parodontitis můžeme dále rozdělit na chronickou a agresivní formu parodontitis, která na rozdíl od chronické formy postihuje i mladé jedince s velmi dobrým stavem ústní hygieny (obrázek 5).

Příčiny počátku a progresse parodontitis jsou zkoumány již tisíce let. Již Hippokrates mezi lety 460-377 př. n. l. přemýšlel o etiologii parodontálních onemocnění. První záznamy zaměřující se na onemocnění, jež dnes označujeme jako parodontitis, jsou datovány před devátým a desátým stoletím. Arabští lékaři spojovali toto onemocnění s měkkým povlakem na zubech. Domněnka, že dentální plak je jedním ze významných etiologických faktorů byla potvrzena v 60. letech 20. století [Jordan et al., 1965, Löe et al., 1965]. Během tohoto období se objevovaly články, v nichž autoři demonstrovali, že krevní sérum pacientů zvyšovalo hladiny antigenů, které reagovaly s bakteriemi dentálního plaku [Mergenhausen et al., 1965].

Obecně se faktory uplatňující se v etiologii parodontitis dělí do dvou skupin: vnitřní a zevní.

Mezi vnitřní faktory ovlivňující onemocnění parodontu se řadí kombinovaná karence vitamínů A a B komplexu, celková onemocnění, pohlaví, věk, rasa, toxické a infekční vlivy a další.

Mezi zevní vlivy ovlivňující vznik parodontitis patří ortodontické anomálie, traumatická artikulace, anatomické odchylky v uspořádání měkkých tkání dutiny ústní, převislé výplně, zubní kámen, kouření a další. Tabákový kouř obsahuje kolem čtyř tisíc škodlivých látek, které se podílejí na alteraci zánětlivé odpovědi organismu. Lokální vazoaktivní a cytotoxické substance z tabákového kouře mohou inhibovat perfuzi, buněčnou proliferaci a metabolismus tkání parodontu. Systémové účinky kouření tabáku se týkají především imunosuprese, funkce kostních buněk v lamina corticalis a zhoršují kinetiku makrofágů. Kuřáci mají nižší relativní abundanci kmenu Proteobacteria ve srovnání s nekuřáky. Rody Capnocytophaga, Peptostreptococcus a Leptotrichia byly zastoupeny méně než rody Atopobium a Streptococcus, které byly naopak u kuřáků zastoupeny ve větším počtu [Wu et al., 2016].

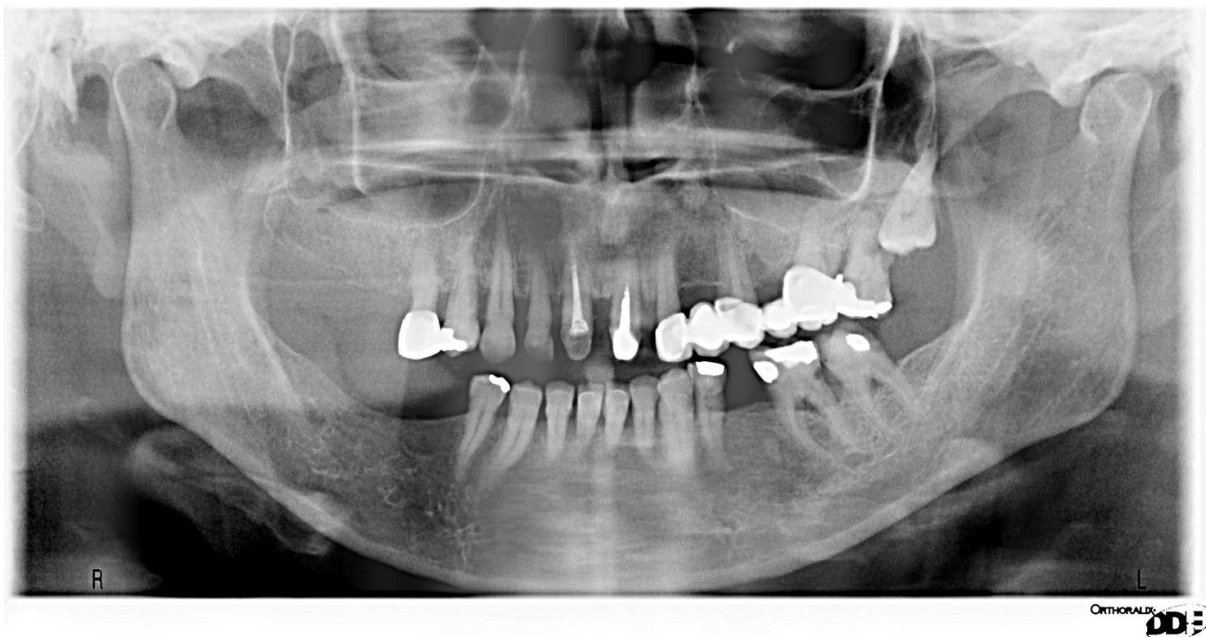
Parodontitis je multifaktoriálním onemocněním, ve kterém hraje významnou úlohu nejen přítomnost patogenních bakterií a imunitní mechanismy, ale i genetická predispozice či dnes velmi často zmiňovaný stres. Zásoby živin v sulkulární tekutině a omezené množství kyslíku v parodontálním chobotu představují ideální podmínky pro výskyt obligátních anaerobů. Nejvíce těchto patogenních bakterií patří mezi gramnegativní bakterie, které obsahují lipopolysacharidy (LPS) – potenciální aktivátor B lymfocytů. Mezi bakterie, které se uplatňují v patogenezi onemocnění patří *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *F. nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* a další. *P. gingivalis* je jednou z nejdůležitějších patogenních bakterií, jejíž produkce proteázy vede k porušení a k deaktivaci IL-1 β . Přítomnost subgingivální mikroflóry je nezbytnou, ale nikoliv jedinou podmínkou rozvoje onemocnění. Geneticky podmíněný defekt v imunitních mechanismech nebo změněná imunitní reakce namířená proti přítomnosti patogenních bakterií mohou být další příčinou rozvoje onemocnění.

Význam bakterií v patogenezi parodontitis prokázali v experimentu Jordan a Keyes v roce 1964 [Jordan a Keyes, 1964] použitím experimentálních bezmikrobních zvířat, která byla osídlena pouze *P. gingivalis* a Loe v roce 1965 [Löe et al., 1965]. Zvířatům byla zavedena ligatura kolem prvního moláru a onemocnění se rozvinulo pouze u zvířat s inokulovanou orální mikroflórou, nikoliv u zvířat kontrolních bez inokulace. Průkaz bakterií v rozvoji parodontitis koreloval s nálezem hladin protilátek specificky reagujících s bakteriemi zubního povlaku v sérech pacientů [Mergenhagen, 1965].



Obrázek 3 – Parodontitis chronica.

Obrázek ukazuje typický klinický obraz stabilizované pokročilé chronické parodontitis s destruovaným parodontem.



Obrázek 4 – Ortopantomogram pacienta s pokročilou chronickou parodontitis.

Na obrázku je patrna horizontální resorpce alveolární kosti postihující i interradikulární prostory zubů 36, 37 a 26, což je typické pro pokročilou formu parodontitis chronica.



Obrázek 5 – Ortopantomogram pacientky s agresivní formou parodontitis.

Obrázek ukazuje typický vertikální typ kostní resorpce a intaktní chrup. Pokročilá forma agresivní parodontitis je také spojena s kostní resorpcí v interradikulárním prostoru. Vzhledem k věku pacientky, který byl v době zhotovení rentgenového snímku 25 let, se jedná o velmi pokročilou destrukci tkání parodontu.

5. Historie problematiky oportunní metastatické infekce dentálního původu

Zuby jsou útvary vyskytující se nejen u člověka, ale i u velké řady dalších živočichů. Zárodky zubů můžeme nalézt u mořských hlemýžďů či ptáků. Tyto zuby se morfologicky ani chemickým složením příliš nepodobají lidským zubům, jsou složeny převážně z chitinu. Zájem o zuby lze pozorovat v dlouhé historii lidstva. Bohužel lidstvo ve svém vývoji nezacházelo se zdravím svého chrupu příliš příkladně. Zubní onemocnění se vyskytovaly od nepaměti a zubním kazem, parodontitis či deformitami chrupu trpěli i naši předci. Dutina ústní představovala a představuje v jistých klinických situacích zdroj infekce šířící se i do vzdálených orgánů. Souvislost přirozené mikrobiální flóry dutiny ústní, mikroorganismů v zánětlivých ložiscích odontogenního původu a vzdáleného patologického stavu nebo celkového onemocnění je obsahem pojmů fokální infekce (tradiční, byť nepřesný) nebo metastatická oportunní infekce (přesnější, ale nevžitý).

První zmínka o metastatické infekci je připisována Hippokratovi, který přisuzoval vyléčení artritidy extrakci zubu [Francke, 1973]. Na začátku 19. století Benjamin Rush, americký lékař a signatář Deklarace nezávislosti, rovněž spojoval vyléčení artritidy s extrakcí zubu [Francke, 1973]. S příchodem mikrobiální teorie onemocnění do Anglie po roce 1850 a do USA po roce 1880 (uspíšeno Kochovou demonstrací *Mycobacterium tuberculosis* jako příčiny tuberkulózy) byl nově vznikající obor mikrobiologie spojován s výrazně přehnanými představami příčiny a léčby [Richmond, 1954]. Autointoxikační teorie se stala nesmírně populární s tvrzením, že bakteriální stáze v tlustém střevě je příčinou systémových onemocnění a čištění střeva se stalo léčbou pro rakovinu žaludku, žaludeční vřed, neuritis, bolesti hlavy, endokarditis, idiocii, mentální apatii, artritida a mnohé další [Beeson, 1992].

V roce 1890 lékař W.D. Miller publikoval svoje pojednání: „The Microorganisms of the Human Mouth: The Local and General Diseases Which are Caused By Them” [Miller, 1890] a o rok později byl poprvé použit výraz: „fokální infekce“ [Miller, 1891]. *Extrakční terapie nebyla touto prací podporována a naopak byl kladen důraz na „léčbu a plnění kořenových kanálků“.*

V roce 1900 anglický lékař William Hunter publikoval v časopise „British Medical Journal“ článek „Sepse jako příčina onemocnění“. V něm označil špatný stav

orálního zdraví, ale i rozmach konzervační stomatologie (zachovávání poškozených zubů stomatologickými zákroky) za příčinu velkého množství onemocnění, jež jsou přisuzována fokální infekci [Hunter, 1900]. Hunter toto téma přednesl studentům medicíny na McGillově univerzitě v Montrealu v roce 1911 a podnítl tak začátek diskuze týkající se fokální infekce dentálního původu.

Éra metastatické infekce dentálního původu naplno začala v roce 1912, když lékař Frank Billings [Billings, 1912] formálně představil koncept fokální infekce americkým lékařům prostřednictvím případových studií připisujících vzdálené infekce různým patogenům, a v dalším kroku navrhnul léčbu těchto infekcí prostřednictvím tonsilektomií a zubních extrakcí, které odstraní ložiska infekce. Billingem byly poprvé popsány mikroorganismy vykultivované z ložisek septické artritidy, které po injikování do pokusných králíků rovněž vyvolaly artritidu [Billings, 1913]. Edmund Kells [Kells, 1920], zakladatel zubní radiologie, byl jedním z mála, kteří odsuzovali neodůvodněné zubní extrakce jako „novodobý zločin“ a doporučoval kolegům, aby odmítali žádosti lékařů týkající se nesprávně indikovaných extrakcí zubů. V následujících letech byl význam fokální infekce dentálního původu podroben kritice a byl rozsáhle revidován.

Zdroj infekce (infekční fokus) je definovaný prostor, pro který platí, že obsahuje patogenní mikroorganismy, může se vyskytovat kdekoli v organismu a obvykle se neprojevuje žádnými klinickými příznaky. Metastatická oportunní infekce (fokální infekce) je lokalizovaná či generalizovaná infekce způsobená diseminací mikroorganismů nebo jejich toxických produktů ze zdroje infekce [Easlick, 1951]. Tyto koncepty vedly k teorii metastatické infekce, která postuluje, že mnohá onemocnění zapříčiněná mikroorganismy (bakteriemi, viry a houbami) vznikají endogenně jako metastatická infekce [Lorber, 1999, Buchen, 2010].

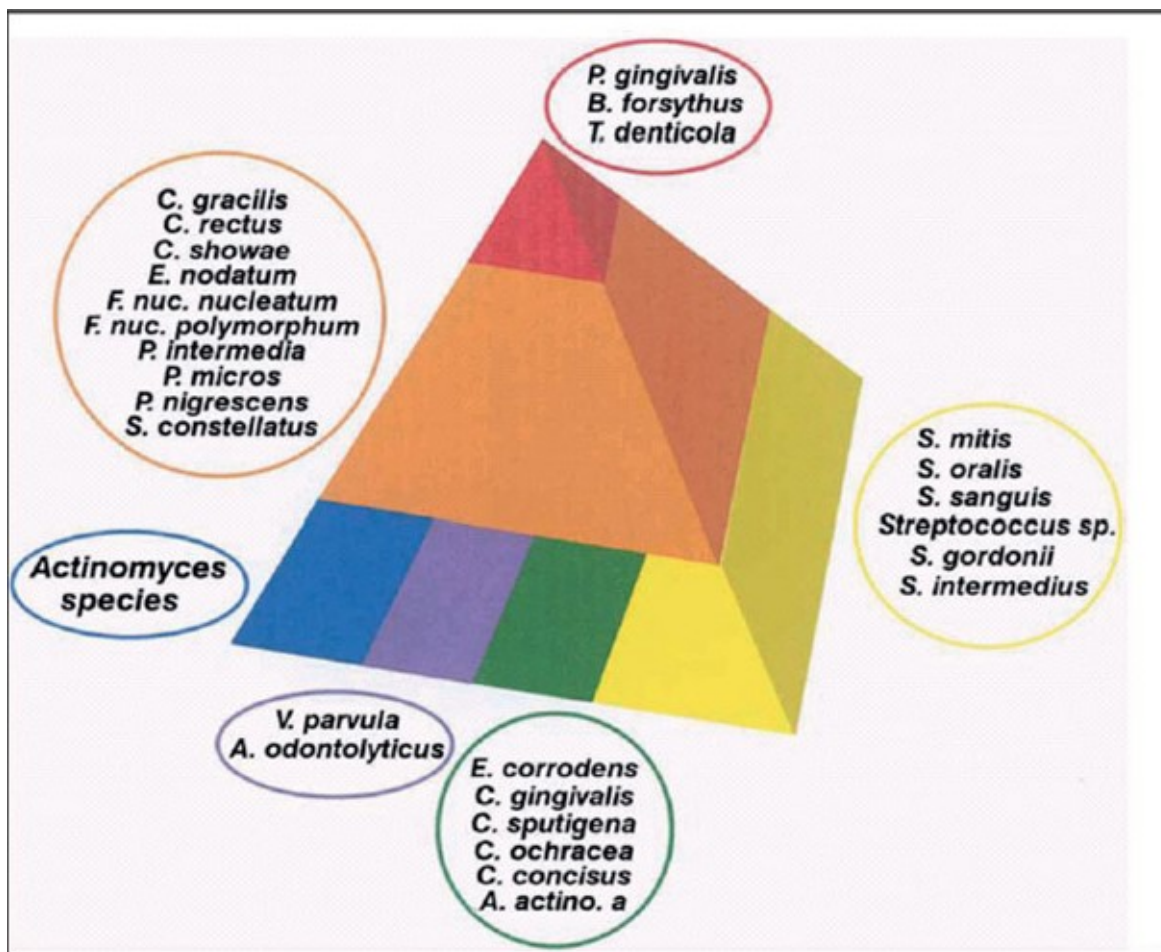
Za zdroje metastatické oportunní infekce se tradičně považují adenoidní vegetace, siny, kůže a dutina ústní, za méně běžné pak prostata, appendix, žlučník a ledviny [Pallash a Wahl, 2000, Murray a Saunders, 2000]. Pokud se podíváme na možné zdroje infekce v dutině ústní detailněji, můžeme uvažovat o apikální periodontitidě, alveolárním abscesu, dentitio difficilis, periostitidě a kolemčelistním zánětu či alveolitidě, parodontálním abscesu, aktivních exsudujících parodontálních chobotech, furkačních defektech, neléčené pokročilé parodontitis, dále pak o generalizované orální sepsi a o nedokonale endodonticky ošetřených zubech, kde

jsou za příčinu infekce považovány viridující streptokoky [Easlick, 1951, Pallash a Slots, 2000, Murray a Saunders, 2000].

Mezi onemocnění, v jejichž patogenezi se může uplatňovat metastatická infekce, byly postupně řazeny artritida, neuritida, myalgie, nefritida, osteomyelitida, endokarditida, mozkové abscesy, infekce kloubních náhrad, kožní abscesy, pneumonie, astma, anemie, gastritida, pankreatitida, colitida, diabetes, struma, thyreoiditida, skupina Hodgkinových onemocnění, horečky neznámé etiologie, nervová onemocnění různých skupin [Beeson 1992, Easlick, 1951, Gibbons, 1998, Hunter, 1911]. V současné době dále patří mezi onemocnění, která jsou spojována s metastatickou oportunní infekcí dentálního původu také: některá nádorová onemocnění [Shrihari et al., 2016], sarkoidóza, sclerosis multiplex, amyotrofická laterální skleróza, autismus, Guillain–Barré syndrom, dětská autoimunitní neuropsychiatrická onemocnění asociovaná se streptokokovou infekcí (PANDAS), Tourettův syndrom, myastenia gravis, polycystóza ledvin, obezita, Alzheimerova choroba, diabetes mellitus, a především KVO [Pallash a Slots, 2000]. U mnoha z výše zmiňovaných onemocnění se uvažuje o patogenezi skrze “antigenní mimikry”. Bakteriální antigeny podobné antigenům hostitele spouštějí imunitní odpověď, která poškozuje tělu vlastní tkáň. Fokální infekce se může šířit krevní i lymfatickou cestou na principu rozsevu samotných mikroorganismů, jejich toxických produktů anebo pouhých imunologicky aktivních komponent vznikajících v důsledku bakteriálního osídlení tkáně dutiny ústní.

6. Bakterie osidlující tkáň parodontu

Orální mikrobiom je neuvěřitelně složitý a čítá 50–100 miliard bakterií. Celkem je uvažováno o více než 700 bakteriálních taxonech podle databáze HOMD (Human oral microbiome database). Ve srovnání s jinými tělními strukturami je orální mikrobiom jedinečný a snadno dostupný [Krishnan et al., 2017]. Mikroorganismy osidlující tkáň parodontu jsou součástí orálního mikrobiomu a v roce 1998 byly Sigmundem Socranským podle patogenity k parodontálním tkáním rozříděny do „barevných“ komplexů (obrázek 6) [Socransky et al., 1998]. Barevné označení odpovídá míře patogenity daného bakteriálního kmene, jak ukazuje obrázek 6.



Obrázek 6 – Schéma rozdělení parodontálních bakterií dle Socranského.

Zdroj: [Sigmund S. Socransky & Anne D. Haffajee, Dental biofilms: difficult therapeutic targets, *Periodontology* 2000 28, 2002, 12–55]

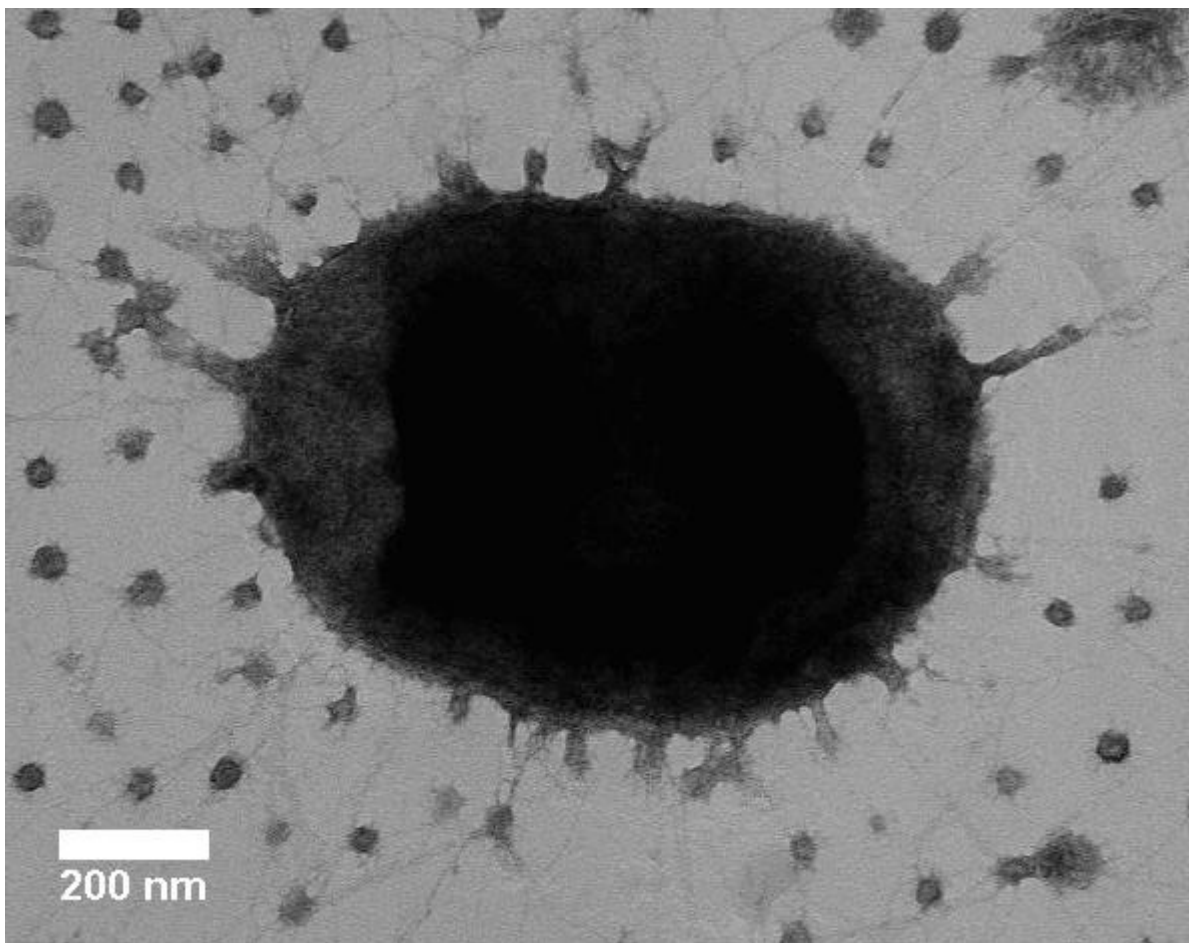
Do žlutého a zeleného komplexu jsou řazeny např. *Eikenella corrodens*, *Streptococcus sanguinis* a mnoho dalších. Do oranžového komplexu byly zařazeny např. *Peptostreptococcus micros*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* aj. Jako „red komplex“ je označována skupina bakterií, které jsou společně řazeny na základě jejich vztahu k těžkým formám onemocnění parodontu (obrázek 6).

Red komplex je tvořen třemi hlavními parodontálními kmeny: *P. gingivalis*, *T. denticola* a *Tanerella forsythia*.

Důležité je na tomto místě zmínit, že samotné třídění bakterií do barevných komplexů jistě není dogmatem. Vztahy mezi jednotlivými bakteriálními taxony jsou velmi pestré a zahrnují symbiózu, komensalismus či parazitismus a společně udržují rovnovážný stav orálního mikrobiomu.

6.1. Red komplex

Mezi tři bakteriální druhy s nejvyšší patogenitou ke tkáním parodontu patří již výše zmíněné: *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *T. denticola*.



Obrázek 7 – *P. gingivalis*

Zdroj: [http://www.pgingivalis.org/ATCC33277\(2\).htm](http://www.pgingivalis.org/ATCC33277(2).htm) (National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR))

P. gingivalis je anaerobní gramnegativní bakterie, která byla detekována v horní části gastrointestinálního traktu a respiračního traktu. Představuje jednu z nejvýznamnějších periopatogenních bakterií orálního mikrobiomu a úspěšného kolonizátora orálního epitelu [Yilmaz et al., 2008]. *P. gingivalis* je etiologickým agens závažných forem parodontitis. Narušení epiteliálních buněk je prvním krokem v iniciaci zánětlivých a imunitních procesů, které jsou příčinou destrukce parodontálních tkání, a které vedou nakonec ke ztrátě zubů [Kinane et al., 2008].

P. gingivalis má schopnost rychlé adherence a též může lokálně invadovat do tkání parodontu a uniknout obranným mechanismům hostitele. K tomu využívá řadu virulentních faktorů, jež jsou příčinnou deregulace vrozené imunitní a zánětlivé odpovědi [Bostanci et al., 2012]. *P. gingivalis* aktivuje buněčnou autofagii a vytváří si vhodné místo pro replikaci, zatímco potlačuje apoptózu. [Bélanger et al., 2006]. Schopnost *P. gingivalis* vyvolat parodontitis dospělých je podmíněna jejím arsenálem virulentních faktorů, mezi které patří např. proteázy označované jako gingipainy. Tyto molekuly vedou k dysregulaci jindy úzce kontrolovaných proteolýz. Výsledkem takovýchto nekontrolovaných proteolýz je například rozvoj edému, aktivace komplementu a krvácení [Travis et al., 1997]. *P. gingivalis* využívá CR3 složku komplementu pro únik před přirozenými imunitními mechanismy [Hajishengallis, 2007]. Produkce vysokých hladin prozánětlivých cytokinů jako jsou IL-1 β a IL-6 z periferních CD4⁺ Th buněk [Gonzales et al., 2014] stimuluje tvorbu dalších prozánětlivých molekul – například CRP, jehož hladina je v plazmě elevována jak při parodontitis, tak i při kardiovaskulárních onemocněních. DNA *P. gingivalis* byla též detekována ve tkáních orgánů mimo dutinu ústní, jako jsou např. tkáně kardiovaskulárního systému [Stelzel et al., 2002] a plodová voda [León et al., 2007] aj.

T. forsythia je anaerobní gramnegativní bakterie osídlující supragingivální i subgingivální oblasti parodontu [Amano et al., 2014]. Její povrch tvoří vnitřní a zevní membrána, růst samotné bakterie umožňuje kyselina N-acetylmuramová, jejíž přítomnost ovlivňuje i její morfologii. Produkce endotoxinů, mastných kyselin a methylglyoxalu je považována za virulentní faktor této bakterie [Sharma, 2010]. Synergie mezi *T. forsythia* a *F. nucleatum*, která je také součástí orálního mikrobiomu, umožňuje tvorbu anaerobního prostředí, které zajišťuje vhodné podmínky pro další anaerobní mikroorganismy dentálního plaku. *T. forsythia* též kooperuje s *P. gingivalis*, což jí umožňuje invadovat do tkání. Společně s dalšími parodontálními bakteriemi byla detekována její DNA ve tkáni srdeční chlopně [Nakano et al., 2008].

T. denticola je obligátně anaerobní gramnegativní pohyblivá bakterie spirálovitého tvaru patřící mezi *Spirochety*. Bakterie obsahuje periplazmatický bičík, který jí díky otáčení umožňuje pohyb. Podmínky k růstu této bakterie jsou splněny

v lidské dutině ústní, konkrétně v subgingiválním zubním plaku, proto je často spojována s onemocněním parodontu [Seshadri et al., 2004]. *T. denticola* má schopnost adherence k různým typům buněk a bazálních membrán, což jí umožňuje struktury fibronektinu, lamininu, fibrinogenu a jiných substrátů. Je pozdním kolonizátorem v rámci procesů tvorby biofilmu a produkuje endotoxinové proteiny. *T. denticola* má schopnost invadovat a přežívat uvnitř lidských gingiválních epitelálních buněk. Důležitou roli v těchto procesech hrají lipidové molekuly a dentilisinové aktivity produkované touto bakterií [Ingaki a Kamizuka, 2016]. Společně s *T. forsythia* a *P. gingivalis* indukuje kaspázy 1 a 4 a účastní se tak buněčné smrti [Jun, 2017]. Též byla detekována ve tkáních kardiovaskulárního systému společně se *Streptococcus mutans* [Nakano et al., 2008].

A. actinomycetemcomitans je fakultativně anaerobní gramnegativní bakterie, která je hlavním etiologickým faktorem především lokalizované formy agresivní parodontitis. Podobně jako další periopatogenní bakterie produkuje řadu virulentních faktorů (leukotoxin, lipopolysacharidy, enzymy aj.). Tyto virulentní faktory modulují imunitní odpověď hostitelského organismu. Při expozici bakterie imunitním buňkám dochází k produkci molekul GroEL, leukotoxinů, lipopolysacharidů a dalších molekul [Gholizadeh et al., 2017]. *A. actinomycetemcomitans* je známa jako příčina systémových onemocnění, jako je infekční endokarditis [Henderson et al., 2003]. Některé sérotypy *A. actinomycetemcomitans* jsou asociovány s parodontálním onemocněním i s onemocněním koronárních arterií [Pietiäinen et al., 2018].

7. Bakteriémie ve vztahu k zubnímu ošetření

Bakteriémie je stav, kdy lze zjistit přítomnost bakterií v krvi. Je pravděpodobné, že primárním místem vstupu orálních bakterií do krve nejsou krevní, nýbrž lymfatické cévy, u nichž tlakový gradient po traumatu směřuje směrem dovnitř lumina (na rozdíl od krevních cév). Proto lze předpokládat, že mastikace je důležitějším zdrojem bakteriémie nežli trauma. Není známo, kolik mikrobů (velikost inokula) je nezbytných k navození metastatické oportunní infekce dentálního původu, a velmi málo se ví i o rozsahu orálně navozené bakteriémie (množství jednotek tvořících kolonie (CFU) v krvi). Z řady studií nevyplývá jednoznačně, že zubní ošetření by bylo větším zdrojem bakteriémie, byť je ve většině případů invazivnější oproti běžným denně prováděným činnostem, jako jsou mastikace a orální hygiena. I přesto je antibiotická profylaxe stále doporučována především u medicínsky kompromitovaných jedinců [Bascones-Martinez et al., 2009]. Je dlouho dokázáno, že náhodné bakteriémie způsobené úkony denně prováděné ústní hygieny a mastikace jsou svou četností srovnatelné s bakteriemií vznikající při stomatologických zákrocích. Například Guntheroth [Guntheroth, 1984] a Roberts [Roberts, 1999] demonstrovali, že riziko bakteriémie vyplývající z normálních činností běžného života je 1000-8000krát pravděpodobnější než riziko bakteriémie vznikající v důsledku stomatologického ošetření. Naopak jiná studie uvádí, že žvýkání nebylo příčinou bakteriémie u pacientů s chronickou parodontitis [Murphy et al., 2006].

Nízká incidence bakteriémie byla prokázána po nasazení nebo sejmutí ortodontických kroužků [McLaughlin et al., 1996, Burden et al., 2004], což odpovídá nízké invazivitě těchto výkonů. Po extrakci zubu byly v krevních kulturách nejčastěji zjištěny bakterie řadící se k *Streptococcus species* a lze shrnout, že zubní chirurgické výkony mohou být příčinou bakteriémie vzhledem ke své vyšší invazivitě [Rajasuo et al., 2004]. Je také otázkou, jak dlouho po stomatologickém ošetření bakteriémie přetrvává. Pozitivní krevní kultury přetrvávaly ještě jednu hodinu po stomatologickém ošetření [Tomás et al., 2007]. Vysoká incidence bakteriémie byla zaznamenána u pacientů bez antibiotické profylaxe po konzervačním a stomatochirurgickém ošetření [Pávek et al., 1990, Lockhart, 2008]. Samozřejmě i bakterie osidlující tkáň parodontu se mohou šířit do cirkulace při stomatologickém ošetření nebo při čištění zubů a indukovat bakteriémii [Kinane et al., 2005]. Pacienti s neléčenou chronickou

parodontitis jsou ve vyšším riziku vzniku bakteriémie po sondáži parodontu než pacienti s chronickou gingivitis [Daly et al., 2001], což je pravděpodobně dáno rozdílnou hloubkou sondáže gingiválního sulku a parodontálního chobotu a případným bakteriálním osídlením obou struktur. Nelze ovšem jednoznačně tvrdit, že v každém parodontálním chobotu musí být vždy vysoká pestrost bakteriálních taxonů a že tato druhová pestrost roste s hloubkou parodontálního chobotu.

8. Aktivace přirozené imunity v dutině ústní a tkáních parodontu

Ústní dutina je permanentně exponována působení bakterií, které formují zubní povlak. Epitel představuje nejen fyziologickou bariéru, ale je také místem interakce přirozené imunitní odpovědi plynoucí z produkce antimikrobiálních peptidů. Důležitými komponentami přirozené imunity na místech kontaktu s mikroorganismy jsou alkalické antimikrobiální peptidy, které obsahují méně než 100 aminokyselin a jsou fylogeneticky velmi staré. Vyskytují se jak v rostlinné, tak v živočišné říši. U savců jsou přítomny v granulích fagocytů, jsou produkovány epitelem a jsou přítomny v tělních tekutinách a sekretech – nejvýznamnější jsou defensiny a cathelicidiny.

Pro obranu v dutině ústní jsou důležité zejména α a β defensiny, calprotectin, histatin a jediný zástupce cathelicidinů u člověka – LL37/hCAP18 [Chung et al., 2007]. Defensiny jsou tvořeny epitelem sliznice a slinnými žlázami a jsou obsaženy v granulích fagocytů, histatin je tvořen slinnými žlázami. Cathelicidin tvořený fagocyty, epitelem a slinnými žlázami se váže na LPS, neutralizuje endotoxinové aktivity a působí chemotakticky na neutrofilů, monocytů, T lymfocytů a žírné buňky a usmrcuje bakterie. Jeho velký význam pro obranu dutiny ústní spočívá v tom, že je přítomen ve vysokém množství ve spojovacím epitelu. Exprese LL-37 ve spojovacím epitelu může být výsledkem migrace neutrofilů [Dale et al., 2001]. Funkční defekty neutrofilů jsou rizikovým faktorem rozvoje časně vzniklé parodontitis, častěji označované jako agresivní parodontitis [Van Dyke et al., 1980].

Jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie zubního plaku obsahují množství strukturálních sekrečních komponent, které buď přímo poškozují tkáně

parodontu nebo stimulují imunitní systém hostitele. U grampozitivních bakterií je buněčná stěna složena z peptidoglykanů, kyseliny teichoové a polysacharidů. Buněčná stěna gram negativních bakterií je tvořena peptidoglykany, oligosacharidy, proteiny, lipidy, LPS a lipoproteiny [Madianos et al., 2005]. Lipopolysacharidy ovlivňují imunitní reakci prostřednictvím vazby na Toll-like receptor 4 (LPS z *Escherichia coli* a *A. actinomycetemcomitans*) nebo Toll-like receptor 2 (LPS z *P. gingivalis*). LPS také stimuluje expresi kostimulačních molekul CD80/CD86, a to prostřednictvím vazby na TLR-4 a dále stimuluje molekuly hlavního histokompatibilního komplexu MHC-II, které jsou důležité v aktivaci T buněk.

Peptidoglykany aktivují buňky vazbou na TLR-2 receptor, jsou rozpoznávány komplementem a specifickými receptory [Medzhitov, 2001] a podílí se i na aktivaci komplementu.

Imunitní odpověď, která je mířená proti infekci, však zároveň vede k další destrukci tkáně [Chung et al., 2003]. Experimentálně in vitro bylo prokázáno, že buňky spojovacího epitelu aktivované *P. gingivalis* tvoří TNF- α a IL-1 β a exprimují povrchové molekuly CD54 a CD106 [Curtis et al., 2001]. Ovlivnění systému cytokinů orálními bakteriemi je mnohem komplikovanější. Bylo prokázáno, že *P. gingivalis* inhibuje akumulaci IL-8 v gingiválních epiteliálních buňkách [Darveau et al., 1998]. *P. gingivalis* také produkuje proteázy, které štěpí a inaktivují IL-1 β , a cysteinovou proteázu – gingipain, která specificky štěpí CD14 receptor pro LPS. Tento enzym umožňuje bakteriím suprimovat imunitní odpověď proti LPS [Bainbridge a Darveau, 2001]. Mechanismus byl označen termínem „lokalizovaná chemokinová paralýza“. Gingipain produkovaný *P. gingivalis* štěpí proteiny za argininem nebo lysinem. Primárním cílem štěpení je získat peptidy a aminokyseliny potřebné k přežití bakterií. Dále však též štěpí řadu důležitých molekul na povrchu buněk nebo v jeho okolí a tím chrání *P. gingivalis* před imunitní reakcí. Štěpí také IL-8, IL-1 α , IL-6 [Zhang et al., 1999, Fletcher et al., 1997], povrchové molekuly CD54 (intracellular adhesion molecules) na epitelových buňkách [Tada et al., 2003], CD14, LBP molekuly na povrchu monocytů a fibroblastů [Tada et al., 2002], složky komplementu a degraduje imunoglobuliny [Sundqvist et al., 1985].

8.1. Vliv proteáz a heat shock proteinů (Hsp) z bakterií dentálního plaku

Na základě bakteriální stimulace nebo případně stimulace jejich složkami (LPS, peptidoglykany) dochází k aktivaci v podstatě všech myslitelných komponent imunitního systému, tzn. k produkci celé řady zánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF α , IL-6, INF- γ , IL-12, IL-10), chemokinů (např. monocytárního chemotaktického proteinu 5), IL-8, makrofágového zánětlivého proteinu 1 α , prostaglandinu PGE2 a NO [Shapira et al., 1998, Haraszthy et al., 2000].

Hladiny IL-6 se signifikantně zvyšují 8 hodin po odstranění zubního kamene (scalingu), zatímco hladiny IL-8 se snižují [Forner et al., 2006]. Vyšší hladiny IL-6 byly detekovány v séru u pacientů s parodontitis ve srovnání se zdravými kontrolami [Loos et al., 2000]. IL-10 je studován spíše ve vztahu k možnému využití v léčbě parodontitis vzhledem k jeho inhibičnímu vlivu na činnost osteoklastů [Zhang et al., 2014].

Heat shock proteiny (Hsp) jsou známy jako nejvýraznější bakteriální imunogenní antigeny. Rozsáhlá homologie mezi lidskými a bakteriálními heat shock proteiny by mohla hrát roli v aktivaci aterosklerotických změn [Nakamoto et al., 2014, Maleki et al., 2016, Seymour et al., 2007]. Tento vztah byl například studován mezi Hsp60 *P. gingivalis* a autoimunitní aterosklerózou. Využíván byl syntetický peptid 19 (TLVVNRLRGSLKICAVKAPG) specifický T buněčným liniím, který byl získán z aterosklerotických plátů a zánětlivě změněné gingivy. 30 % pacientů s parodontitis a 100 % pacientů s aterosklerózou reagovalo pozitivně na peptid 19 z *P. gingivalis* a lidského Hsp60. Peptid 19 specifické T buněčné linie prokázaly fenotyp charakteristický pro pomocné T buňky (CD4⁺), ale neexprimovaly CD25, účastníci se suprese T buněk, nebo forkhead box P3 (FOXP3), což je hlavní molekula regulující cesty rozvoje a funkce regulačních T buněk [Hori, 2003, Choi, 2011]. Studován byl vztah mezi parodontálními patogeny (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum* a *A. actinomycetemcomitans*), které pravděpodobně také exprimují Hsp60, a protilátkami anti-human heat shock protein 60 (hHsp60) u pacientů hospitalizovaných s infarktem myokardu. Hodnoty hHsp60 byly zvýšeny u pacientů s vyššími hladinami *P. gingivalis* a *T. forsythia* [Leishman, 2012]. *T. forsythia* navíc indukuje uvolňování high mobility group box proteinu 1 společně s Hsp60

a fibronektinem, což vede dále k aktivaci kaspázy 1 a 4 a tím k buněčné smrti [Jun, 2017].

Hodnocena byla korelace mezi dyslipidemií (lipoproteiny o nízké hustotě LDL a lipoproteiny o vysoké hustotě HDL) a sérovým Hsp60. Stejná studie byla rozšířena o imunohistochemické hodnocení Hsp60 z orální sliznice u pacientů s neléčenou mírnou parodontitis ve srovnání se zdravými kontrolami. Hodnoty slizniční Hsp60 se signifikantně neměnily, ovšem sérové hladiny Hsp60 a LDL u pacientů s neléčenou mírnou parodontitis ukazovaly silnou pozitivní korelaci s body mass indexem a věkem mezi oběma skupinami [Rizzo, 2012].

Snížená produkce INF- γ po stimulaci periferních mononukleárů prostřednictvím Hsp60 a Hsp70 byla zjištěna u pacientů s parodontitis ve srovnání se zdravými kontrolami. Zmíněné nálezy podporují hypotézu, že u pacientů s parodontitis je snížena Th1 odpověď, která by mohla vést k vyšší vnímavosti k rozvoji agresivní parodontitis.

Protilátky proti lidskému Hsp60 a protilátky proti PgGroEL, což je označení pro B-buněčné epitopy na povrchu *P. gingivalis* [Maeda, 2000], byly zjištěny v séru a v zánětlivých gingiválních tkáních u pacientů s parodontitis [Tabeta a kol. 2000]. Kvantitativní analýzy sérových protilátek ukázaly signifikantní vzestup hodnot u pacientů s parodontitis ve srovnání se zdravými kontrolami. Anti-*P. gingivalis* GroEL protilátky byly detekovány ve všech vzorcích zánětlivě změněné gingivální tkáně u pacientů s parodontitis. Zvýšené hodnoty protilátek proti Hsp60 byly též zjištěny v séru pacientů s pozitivními aterosklerotickými změnami [Chung et al., 2003]. Molekulární mimikry mezi GroEL periopatogenní *P. gingivalis* a autologním lidským Hsp60 by mohly hrát roli v imunitních procesech při parodontitis.

Experimenty prováděné na zvířecích modelech ukazují, že bakteriální infekce by mohla vést ke zvýšení produkce protilátek proti Hsp60, který je exprimován endotelem krevních cév v oblasti bifurkace. Protilátky vážící se k endoteliálnímu povrchu by mohly být stěžejním mechanismem zánětlivého autoimunitního onemocnění [Wick, 2000].

Několik studií ukázalo, že imunitní odpověď na Hsp60 by se mohla účastnit na patogenezi jak aterosklerózy, tak chronické parodontitis. Hladiny protilátek proti lidským Hsp60, stejně jako proti Hsp60 *P. gingivalis*, byly nejvyšší u pacientů s aterosklerózou ve srovnání se zdravými pacienty. Klonální analýza T buněk

v periferní krvi pacientů s aterosklerózou jasně demonstrovala přítomnost jak T buněk reaktivních vůči lidským Hsp60, tak i T buněk reaktivních vůči GroEL *P. gingivalis*. Tyto výsledky naznačují, že klony T buněk se stejnou specifitou by se mohly účastnit na patogenezí těchto odlišných onemocnění [Yamazaki a Nakajima, 2004].

Analýza nukleotidových sekvencí T buněčného receptoru (TCR) prokázala, že T buňky reaktivní proti lidským Hsp60 a T buňky infiltrující parodontální léze mají stejné receptory, a pravděpodobně tedy dochází k akumulaci T buněk reaktivních proti lidským Hsp60 v parodontálních lézích [Yamazaki et al., 2002]. Analýza profilů cytokinů ukázala, že periferní krevní mononukleární buňky reaktivní proti Hsp60 produkovaly významné hladiny INF- γ u pacientů s parodontitis, kdežto GroEL *P. gingivalis* neindukovala profily cytokinů typu 1 a 2. U kontrolních subjektů nebyla zaznamenána žádná zvýšená exprese INF- γ nebo IL-4. Tyto výsledky naznačují, že pacienti s parodontitis mají v periferní krvi T buňky reaktivní proti lidským Hsp60 s typem 1 cytokinového profilu [Yamazaki a Nakajima, 2004]. V jiné studii [Ford et al., 2005] byla popsána zkřížená reaktivita periferních krevních T buněk reaktivních proti GroEL, periferních krevních T buněk reaktivních proti lidským Hsp60 a T buněk z aterosklerotických plátů reaktivních specificky proti *P. gingivalis*. Cytokinové profily arteriálních T buněčných linií reaktivních specificky proti GroEL, lidským Hsp60 a *P. gingivalis* byly predominantně Th2 v případě CD4⁺ buněk a Tc0 v případě CD8⁺ buněk.

GroEL patří do rodiny chaperoninů, což jsou molekuly nalézající se u velkého množství bakterií. Jsou nezbytné pro správné složení proteinů. Hsp60 jsou u eukaryotních buněk strukturálně i funkčně velmi blízké molekulám GroEL. Povaha zánětlivého infiltrátu a přítomnost Hsp a GroEL byly zkoumány po endarterektomii u 31 vzorků karotid. Lidský Hsp60 byl detekován na povrchu endoteliálních buněk, buněk hladké svaloviny a lymfocytů; GroEL a bakterie byly detekovány uvnitř buněk intimy [Ford et al., 2006]. Endogenní Hsp je také cílem autoprotilátek u autoimunitních onemocnění, aterosklerózy a cévních onemocnění. Hsp je jedním z endoteliálních buněčných antigenů schopných spustit cytotoxickou a apoptotickou odpověď odpovídajícími autoprotilátkami [Alard et al., 2007, Wick et al., 2001]. Aterogenní vliv po opakovaných imunizacích pomocí *P. gingivalis*, bakteriálních a hostitelských Hsp a GroEL byl zkoumán u ApoE ^{-/-} deficientních myší. Tato

imunizace podporovala rozvoj aterosklerózy. Rozvoj lézí v proximální aortě koreloval s hladinami Hsp60 a anti-GroEL protilátek a mohl by být vysvětlen molekulárními mimikry mezi GroEL a Hsp60 [Ford et al., 2007].

9. Parodontitis a systémová onemocnění

Parodontitis je infekční onemocnění, které má za následek zánět parodontu vedoucí k jeho destrukci. Vzájemné komplexní vztahy mezi parodontitis a vnitřním systémem organismu jsou intenzivně studovány.

Důležité je říci, že parodontitis není hlavním etiologickým faktorem systémových onemocnění a též systémová onemocnění, poruchy a stavy nejsou příčinou parodontitis, nýbrž mohou být predisponujícím faktorem, mohou zvyšovat či akcelarovat progresi onemocnění parodontu. Epidemiologické studie předpokládají asociaci mezi onemocněním parodontu, zdůrazňují přitom chronickou parodontitis, a četnými klinicky důležitými systémovými onemocněními zahrnující KVO, respirační onemocnění, DM I. typu, komplikace v průběhu těhotenství, nádory pankreatu, Alzheimerovu chorobu aj. [Akshata et al., 2012, Chapple et al., 2013, Chen 2014].

U celé řady dalších systémových onemocnění jsou studovány společné mechanismy s parodontitis. KVO jistě patří mezi nejvýznamnější skupinu onemocnění, jejichž korelace s parodontitis je intenzivně studována, i vzhledem k jedné z nejvyšších mortalit na KVO. Mezi další onemocnění můžeme řadit obezitu, respirační onemocnění [Scannapieco et al., 1999, Zhou et al., 2014], chronická onemocnění ledvin [Loesche, 1999], revmatoidní artritida, kognitivní poruchy, nízkou novorozeneckou hmotnost [Sha, 2009], sclerosis multiplex, metabolický syndrom, onkologická onemocnění [Linden et al., 2013], [Chen, 2014], karcinom pankreatu [Chang et al., 2016].

10. Parodontitis a kardiovaskulární onemocnění

Epidemiologické studie prokázaly, že parodontitis patří mezi vedlejší rizikové faktory KVO [Beck a Offenbacher, 2001]. Řada klinických studií prokázala asociační vztah mezi KVO a parodontitis. Navrženo bylo několik mechanismů, které by měly spojovat KVO a parodontitis. Původně se uvažovala patogenetická osa parodontitis – zvýšené hladiny CRP – zvýšené riziko KVO [Beck, 1998]. Další studie se zaměřují na osídlení tkání kardiovaskulárního systému orálními bakteriemi a parodontálními bakteriemi [Fernandes et al., 2014]. Pomocí PCR reakce byla detekována mikrobiální ribosomální RNA (rRNA) a DNA z *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* a *P. intermedia* v aterosklerotických plátech [Haraszthy et al., 2000; Taylor-Robinson et al., 2002; Fiehn et al., 2005; Ford et al., 2005]. Otázkou zůstává, jakou funkci orální či parodontální bakterie ve tkáních kardiovaskulárního systému (KVS) vlastně zastávají a zda závisí více na kolonizaci tkání KVS jednotlivými bakteriálními taxony či je podstatnější větší hustota bakteriálního osídlení ve tkáních KVS [Ott et al., 2006]. U zvířecích modelů infekce *P. gingivalis* zvyšuje objem aterosklerotického plátu s akumulací esterů cholesterolu a mediátorů zánětu [Hayashi et al., 2011].

Další mechanismus, o kterém se uvažuje v korelaci obou onemocnění, je založen na jak lokální, tak systémové zánětlivé a imunitní reakci, se zvyšujícím se počtem bílých krvinek, C-reaktivním proteinem, fibrinogenem, buněčnými adhezními molekulami a prozánětlivými cytokiny [Mustapha et al., 2007].

Naopak řada studií tento vztah přinejmenším zpochybňuje, a to i vzhledem k nedostatečným vědeckým důkazům založeným na použití nepřesných měření týkajících se onemocnění parodontu a nízké statistické síle pro klinicky významné události [Stewart a West, 2016]. Povaha tohoto vztahu je ovšem stále nejasná, protože obě onemocnění sdílejí množství společných rizikových faktorů [Tonetti, 2009]. Společné všeobecné rizikové faktory pro KVO i parodontitis zahrnují zvyšující se věk, kouření, abusus alkoholu, etnikum, vzdělanostní a socioekonomický status, mužské pohlaví, diabetes mellitus a obezitu [Peacock a Carson, 1995, Hujoel et al., 2000, Armitage, 2000]. Kontrolní pozorovací studie potvrzují vztah mezi aterosklerózou a parodontitis, ale neprokazují přímé příčinné vztahy. Je spíše tendence nahlížet na problematiku obecněji a vnímat parodontologickou léčbu jako

nástroj k potlačení systémového zánětlivého stavu, což se ve výsledku projeví i na markerech aterogenity a na endoteliální funkci [Lockhart et al., 2012].

Mezi KVO, v jejichž etiopatogenezi se uvažuje o parodontitis, patří ateroskleróza a její komplikace a bakteriální endokarditis.

Společným průsečíkem parodontitis a infekční endokarditis zůstává bakteriální etiopatogeneze. Studium mechanismu účinku parodontálních bakterií v inciální fázi tvorby aterosklerotického plátu či ve fázi progresse aterosklerotického procesu, je předmětem odborných diskuzí. Rozvoj molekulární biologie úzce souvisí se zvýšením úspěšnosti diagnostikovaných bakteriálních endokarditid, v jejichž etiopatogenezi se uplatňují grampozitivní i gramnegativní bakterie.

Bakteriální endokarditis vzniká inkorporací cirkulujících bakterií do matrix tvořené trombocyty a fibrinem na povrchu srdečních chlopní (především aortální, mitrální a trikuspidální, zřídka pulmonální) v důsledku nekompletní endotelizace nebo drobných traumat. Z kohortové studie týkající se 138 876 dospělých s náhradou srdeční chlopně bylo prokázáno možné přispění invazivních stomatologických zákroků k rozvoji infekční endokarditidy [Tubiana et al., 2017].

Grampozitivní rody *Streptococcus*, méně často *Staphylococcus* a *Enterococcus* využívají adhesinů, díky kterým mají schopnost přichytit se na poškozený endotel chlopně a negativně ovlivňují funkci endoteliálních buněk. Bakteriální komponenty jako dextran, destičky vázící protein a kyselina teichoová byly popsány jako molekuly uplatňující se v adhezi ke stěně srdeční chlopně na matrix tvořené trombocyty a fibrinem [Brown a Griffin, 1998]. Grampozitivní *Streptococcus sanguinis* produkuje dextran a může být až ze 60 % příčinou agregace trombocytů, což je zprostředkováno s trombocyty asociovaným agregujícím proteinem (PAAP) [Herzberg et al., 1983]. Aktivované krevní destičky uvolňují alfa granule, které v kombinaci s produkcí tromboxanu hrají roli v pozdější agregaci trombocytů. Alfa granule obsahují destičkový mikrobiální protein, který naopak působí baktericidně a indukuje produkci fibrinogenu a koagulačních faktorů V a VII. Později aktivuje thrombin, který iniciuje polymeraci fibrinogenu na fibrin [Herzberg, 1996]. V etiopatogenezi infekční endokarditis byl také popisován účinek *Streptococcus gordonii*, který může produkovat fibronektin, který je adsorbován ke kolagenu srdeční chlopně [Lowrance et al., 1988]. Infekční endokarditis se v 10-25 % objevuje jako těžká komplikace bakteriémie *Staphylococcus aureus* [Bouchiat et al.,

2015]. Viridující streptokoky jako *Streptococcus bovis* a *Staphylococcus aureus* jsou producenty glukosyltransferázy, která je jednou ze složek formujících biofilm na povrchu zubu [Coykendall et al., 1989], proto i zde je uvažováno o vzájemné souvislosti mezi těmito kmeny, které se vyskytují v dentálním plaku i v endokardu.

Do druhé skupiny jsou zařazeny gramnegativní bakterie s nízkou patogenitou označovány HACEK (*Haemophilus species*, *Aggregatibacter species*, *Cardiobacterium hominis*, *E. corrodens* a *Kingella species* a někteří zástupci hub) [Kupferwasser a Bayer, 2000]. Dále do této skupiny patří rody *Gemella*, *Granulicatella* a *Abiotrophia sp.* – *Propionibacterium acnes*, *Candida sp.*

Třetí skupinu tvoří obtížně kultivovatelné intracelulární bakterie *Bartonella sp.*, *Coxiella burnetti* a *Tropheryma whipplei*. Poslední zmiňovaná byla opakovaně diagnostikována PCR ze srdečních chlopní [Tattevin et al., 2015]. Další gramnegativní bakterií, jejíž genotypy fimbrií (*fimA*) byly detekovány v kardiovaskulárních vzorcích, je *P. gingivalis* [Nakano et al., 2008].

Ateroskleróza i parodontitis jsou zánětlivými onemocněními, pro která je typický výskyt cytokinů - malých signálních molekul, eikosanoidů, sfingosin-1-fosfátu (S1P), CRP, TNF- α , prostaglandinu E2 (PGE2), IL-1 β a IL-6 a enzymů, které modulují iniciaci obou těchto chronických zánětlivých onemocnění. Některé tyto molekuly mohou urychlit vývoj již existujících aterosklerotických plátů a jsou spojeny se zvýšeným počtem nežádoucích kardiovaskulárních příhod [Weidlich et al., 2008].

Společným prozánětlivým cytokinem je destičky aktivující faktor (PAF), jehož hladiny jsou shodně elevovány u aterosklerózy i parodontitis. Studie Chena naznačuje, že elevace PAF jako prozánětlivého cytokinu v důsledku rozvoje parodontitis, jejíž začátek je obvykle datován dříve než plně rozvinutý proces aterosklerózy, a dřívější produkce prozánětlivého mediátoru PAF, by mohla hrát významnější roli v časných fázích rozvoje aterosklerózy. Rovněž se předpokládá i opačný efekt aterosklerotického procesu na rozvoj parodontitis [Chen et al., 2010]. Dalšími společnými mediátory mezi parodontitis a KVO by mohly být s-PLA2 a s lipoproteinem asociovaná fosfolipáza A2. Tyto fosfolipázy jsou spjaty s aterosklerózou a je uvažována možná souvislost mezi s-PLA2, parodontálními bakteriemi a subklinickým rozvojem aterosklerotických změn v cévní stěně [Boillot et al., 2015].

Epidemiologické studie dále naznačují, že infekce různými typy bakterií (*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*) a přítomnost produktů těchto bakterií (lipopolysacharidy, heat shock proteiny) v séru se podílejí na rozvoji aterosklerózy [Valtonen, 1999]. U pacientů s prokázanými aterosklerotickými změnami byla dále zjištěna v séru zvýšená hladina protilátek proti Hsp60 [Chung et al., 2003]. Experimenty na zvířecích modelech ukazují, že infekce může vést ke zvýšené tvorbě protilátek proti Hsp60, a tyto protilátky se mohou vázat na Hsp60 exprimovaný na modelu cév v místě, kde dochází k jejich bifurkaci a kde je tudíž endotel v určitém stresu. Navázání protilátek na povrch endotelu může být spouštěcím mechanismem zánětlivého autoimunitního onemocnění [Wick, 2000].

10.1. Aterogeneze ovlivněná mediátory zánětu vzniklými reakcí na antigeny z dentálního plaku

Na rozvoji chronického zánětu se podílejí složky přirozené i specifické imunity. Je několik možných mechanismů, kterými mohou bakterie zubního povlaku iniciovat nebo zhoršovat aterosklerotické procesy:

1. aktivace přirozené imunity
2. mediátory zánětu vzniklé reakcí na antigeny z dentálního plaku
3. účast proteáz a heat shock proteinů (HSP) z bakterií dentálního plaku

Schopnost *P. gingivalis* aktivně invadovat aortální a srdeční endoteliální buňky je příkladem vztahu mezi parodontitis a aterosklerózou.

Vztah mezi aterosklerózou a *P. gingivalis* byl potvrzen experimentálně na myším modelu. Rozvoj parodontitis a aterosklerózy byl indukován inokulací orální *P. gingivalis*. V průběhu čtyř měsíců se u myši objevily lipidové proužky, ve kterých byla detekována přítomnost *P. gingivalis*, a u myši s parodontitis byly zjištěny v aortě vyšší sérové hladiny IL-6 a CD106 než u kontrolních jedinců [Lalla, 2003]. Lipopolysacharidy stimulují monocyty/makrofágy vazbou na receptor CD14. Např. *P. gingivalis* produkuje proteázy, jež spojují a inaktivují IL-1 β a gingipain, který specificky váže CD14 (receptor pro lipopolysacharid). Tento enzym umožňuje bakteriím potlačit imunitní reakci proti lipopolysacharidům [Bainbridge a Darveau,

2001]. Geneticky podmíněná reakce makrofágů na bakteriální stimulaci může hrát určitou roli v patogenezi aterosklerózy.

10.2. Parodontitis a systémové markery

Ve vztahu k parodontitis, ať k agresivní či chronické formě, je intenzivně studována řada systémových markerů, mezi které patří albumin, globulin, celkový protein, počet leukocytů, neutrofilů a lymfocytů, leptin, lipocalin, fibrinogen, elastáza, IgA, IgG, CRP, řada cytokinů, prostaglandinů, adhezivních molekul aj. Studium těchto systémových markerů hraje důležitou roli v uvažovaných souvislostech mezi parodontitis a KVO. Hladiny některých systémových markerů by též mohly korelovat s preklinickými stavy obou onemocnění a mohly by tudíž sloužit k predikci onemocnění ještě před výskytem samotných klinických projevů onemocnění. Co se týče léčby parodontitis, v současné době nemáme žádný systémový marker, který by mohl sloužit k odhalení možného rizika vzniku parodontitis nebo který by sloužil k monitoringu parodontitis v době bez klinických projevů a byl by používán rutinně, což by bylo zvláště u agresivní formy parodontitis postihující mladé jedince velmi cenné. Ve studii Lopézové bylo dosaženo závěru, že tradiční markery zánětu reflektují na vážnost a rozsah poškození parodontálních tkání, vzhledem ke korelaci s indexy PI (Plaque index), BOP (Bleeding on probing), PD (Pocket depth) ≥ 4 mm, CAL (Clinical attachment loss) ≥ 2 mm s hladinami leukocytů a neutrofilů. Elevované hladiny počtu leukocytů by mohly být rizikovým faktorem pro KVO [Lopéz et al., 2011].

Lymfocyty hrají základní roli v patogenezi parodontitis. Přirozená adaptivní imunitní odpověď je kontrolována T buňkami regulovanými B buňkami a produkcí protilátek. V některých studiích byl popsán signifikantní rozdíl v počtu lymfocytů mezi zdravými kontrolami a pacienty s agresivní formou parodontitis [Chen et al., 2016].

Vzrůstající počet trombocytů může být výsledkem zánětlivých či infekčních dějů, někdy také označován jako fenomén „reaktivní trombocytózy“ [Safar Iqbal et al., 2015]. Parodontitis, která je spojena se změnou počtu trombocytů, byla v tomto ohledu studována a výsledky různých studií nejsou shodné. Signifikantní vztah mezi počtem trombocytů a parodontitis byl potvrzen studií Al-Rasheeda. [Al-Rasheed, 2012].

Imunoglobuliny IgA a IgG patří mezi základní třídy protilátek. IgG protilátky se uplatňují v opsonizaci, aktivaci komplementu, v sekundární imunitní reakci a neutralizaci toxinů. Podtřída IgA mimo jiné reaguje s ahezivními molekulami bakterií, které tímto blokuje. Proto byla studována predikce infarktu myokardu u pacientů bez KVO prostřednictvím hladin IgA a IgG protilátek proti hlavním parodontálním patogenům *P. gingivalis* a *A. actinomycetemcomitans*. Ovšem z výsledků této studie nevyplýval signifikantní vztah mezi hladinou IgA a IgG a rizikem infarktu myokardu [Pussinen et al., 2004].

10.3. C reaktivní protein

CRP byl objeven v roce 1930 studiem jedinců s infekcí *Streptococcus pneumoniae* [Tillett a Francis, 1930]. Jedná se o plazmatický protein, který je členem tzv. pentraxinové skupiny proteinů, jež odráží odpověď organismu na akutní fázi zánětu a je jedním z markerů monitorujících tuto odpověď. CRP je tvořen zejména v játrech, ale jeho syntéza byla prokázána též extrahepálně. Induktorem genu pro CRP je IL-6. CRP se podílí na systémové odpovědi zánětu. Molekula CRP se váže na specifické molekuly produkované během buněčné smrti nebo nalézající se na površích různých bakteriálních patogenů, váže se na oxidovaný lipoprotein nízké denzity (ox-LDL), a také na oxidované fosfolipidy. Neváže se naopak na nativní LDL. Předpokládá se, že CRP je zahrnut v modulaci rozvoje aterosklerózy, neboť jak CRP tak ox-LDL jsou přítomny v aterosklerotických lézích. Hladina CRP může být asociována s rizikovými faktory KVO, zvláště u pacientů nad 75 let s chronickou parodontitis [Strandberg a Tilvis, 2000]. Koncentrace CRP by mohla popisovat úspěšnost léčby parodontitis a riziko KVO [Bloemenkamp et al., 2002, D'Aiuto et al., 2004].

Rychlý vzestup syntézy CRP řádově během hodin po infekci předpokládá jeho podíl na hostitelské odpovědi, a je tedy součástí vrozené imunitní odpovědi [Black et al., 2004]. CRP je produkován jako odpověď na různé formy poškození tkání, jako jsou například infekční onemocnění, traumata a hypoxie. Hodnoty CRP jsou též asociovány s obezitou, hladinou sérových lipidů, kouřením, diabetem a onemocněním parodontu [Gomes-Filho et al., 2011]. U pacientů s parodontitis jsou nalézány změny v krevních buňkách i molekulárních komponentách v periferní krvi v důsledku zánětlivých změn parodontálních tkání [López et al., 2011].

Plazmatické hladiny CRP stoupají rychle a výrazně, běžně 100-krát a více během 72 hodin po poškození tkání, ale mohou vzrůst i více jak 1000-krát v průběhu delšího období po akutním zánětlivém stimulu. Proto slouží CRP jako senzitivní marker, který hodnotí zánětlivý stav [Black et al., 2004, Bansal et al., 2014]. Pozitivní korelace mezi závažností parodontitis a CRP byla prokázána mnoha studiemi [Goyal et al., 2014, Linden et al., 2008, Eickholz et al., 2013, Jayaprakash et al., 2014, Pradeep et al., 2010], též byly porovnávány klesající hodnoty CRP po nechirurgické parodontologické léčbě [Marcaccini et al., 2009, Musalaiah et al., 2014, Koppolu et al., 2013, Zhou et al., 2013, Radafshar et al., 2010].

Mnoho studií se zaměřilo na hodnoty CRP u pacientů s chronickou parodontitis, ale jen velmi málo se zabývalo pacienty s agresivní parodontitis [Goyal et al., 2014].

Pozitivní korelace mezi CRP a závažností parodontálního onemocnění u mladých pacientů by mohla být důvodem vztahu mezi postižením parodontu a zjištěným vyšším rizikem KVO u pacientů s parodontitis, jak bylo zmíněno ve studii Goyal a kol. [Goyal et al., 2014]. Mediátory zánětu – sérová elastáza a CRP jsou spojovány se vzrůstajícím rizikem onemocnění koronárních cév. Wohlfeil a kol. srovnávali tyto mediátory zánětu u parodontologicky zdravých kontrol s pacienty s agresivní či chronickou parodontitis. Sérová elastáza a CRP byly výrazně elevovány u pacientů s neléčenou agresivní parodontitis ve srovnání se zdravými kontrolami [Wohlfeil et al., 2012]. Pacienti s agresivní parodontitis mají signifikantní nárůst hodnot CRP ve srovnání se zdravými kontrolami. Parodontitis je lokální zánětlivý proces s destrukcí periodontia vyvolaný bakteriálním insultem, vedoucí k systémové zánětlivé reakci hostitele. Epidemiologicky je spojována s KVO, se zvýšenou hladinou reaktantů akutní fáze zánětu. Zvýšené sérové hodnoty CRP a počtu neutrofilů u pacientů s chronickou parodontitis naznačují příspěvek onemocnění k celkové zánětlivé zátěži organismu a potenciálně i k riziku vzniku kardiovaskulárních příhod [Kalburgi et al., 2014].

11. Detekce bakteriální DNA z tkáně srdeční chlopně metodou pyrosequenování

Technický pokrok v posledních 20 letech významně posunul možnosti identifikace mikroorganismů osidlujících tkáně a orgány lidského těla. Sekvenační metody nové generace dnes umožňují nejen identifikaci přítomných mikroorganismů (všech, nikoli jen těch kultivovatelných), ale také alespoň semikvantitativní stanovení jejich relativní abundance. Přitom pro takovou komplexní charakterizaci orálního mikrobiomu je dostačující odběr malého množství sulkulární tekutiny papírovým čepem, ze kterého je izolována celková DNA. Z té se metodou PCR pomocí univerzálních primerů amplifikuje některý z variabilních úseků 16S rDNA, který je dále sekvenován.

Porovnáním získaných sekvencí s databází HOMD (human oral microbiome database) pak lze zařadit získané sekvence do rodu a často i druhu a do značné míry lze i posoudit jejich četnost (počet získaných sekvencí konkrétního typu odpovídá četnosti toho kterého templátu ve vzorku).

V dutině ústní zdravého člověka lze nalézt bakteriální taxony red komplexu, aniž by daný jedinec měl klinické projevy parodontitis. Proto identifikace konkrétního taxonu či několika taxonů, což jsou dosud používané metody, nemá dostatečnou vypovídací hodnotu o stavu orálního mikrobiomu. Významnější je komplexní pohled – nikoli přítomnost jednotlivých bakteriálních taxonů, ale celková rovnováha a vzájemný poměr přítomných mikroorganismů. Sekvenační metody tedy umožňují oproti všem dříve používaným metodám získat komplexní obraz – nejde jen o identifikaci konkrétních druhů, ale celkový obraz, na kterém lze popsat jak zastoupení "dobrých" tak i patogenních taxonů.

Stejnou metodou pak lze určit složení mikrobiomu jakéhokoli orgánu v těle, včetně mitrálních chlopní, pokud nějakým způsobem získáme přístup ke vzorku (např. operace pacientů s aterosklerózou). Porovnáním takto získaných údajů o mikrobiomu dutiny ústní a mitrálních chlopní pak lze získat představu o korelaci výskytu konkrétních taxonů.

12. Experimentální část I

Metodika

Metodika experimentu vychází z identifikace bakteriální DNA ve vzorcích aortální či mitrální chlopně. Do této experimentální části bylo zařazeno v první experimentální skupině 20 pacientů s aortální či mitrální stenózou, u kterých je plánován kardiochirurgický výkon – náhrada aortální či mitrální chlopně. Druhá kontrolní skupina (15 pacientů) obsahovala jedince, kteří neměli postižení parodontu, ale neměli ani klinické příznaky KVO. Pacienti byli do studie zařazeni v souladu s principy Helsinské deklaráce, na podkladě předem podepsaného informovaného souhlasu.

U všech osob zařazených do studie bylo provedeno po podepsání informovaného souhlasu MUDr. Jaroslavem Myšákem detailní popsání stavu všech přítomných zubů a zhodnocení stavu chrupu indexem kazivosti KPE. K hodnocení parodontu bylo použito měření hloubky sondáže PD a index CPI. Vyšetření PD bylo provedeno využitím metody „walking probe“ pomocí kalibrované WHO sondy. Aktivita parodontálních chobotů byla hodnocena BOP indexem. Klinické vyšetření bylo doplněno o rtg vyšetření zahrnující OPG snímek a intraorální rtg snímky. Odběr materiálu pro mikrobiologické sledování představoval neinvazivní odběr obsahu parodontálního chobotu, resp. gingiválního sulku (minimálně dvě lokality, vždy alespoň jedna s nejtěžším postižením a jedna s klinicky zdravým parodontem) pomocí sterilního endodontického papírového čepu po dobu 15 sekund. Papírové endodontické čepy byly sterilizovány při 121 °C a měly průměr ISO 40.



Obrázek 8 – Papírové endodontické čepy

Zdroj: <https://www.mydentistchoice.com/pearl-endopia-absorbent-paper-points-6.html>

Odebraný materiál byl v mikrozkušnicích transportován do laboratoře Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha k molekulárně diagnostickému mikrobiologickému zpracování. Pro izolaci bakteriální DNA ze sulkulární tekutiny byl použit kit DNeasy® Blood & Tissue firmy Qiagen (kat. č. 69504). Bezprostředně před odběrem nebyla prováděna žádná lokální antimikrobiální profylaxe. Po odběru byla pacientovi podána minimálně dávka amoxicilinu s kys. klavulanovou 2 g per os a 30 minut poté bylo provedeno odstranění zubního kamene s následným výplachem dutiny ústní roztokem chlorhexidini digluconati 0,2 % po dobu 1 min.

Pro potřeby studie byly využity výsledky standardně prováděného předoperačního vyšetření pacientů – fyzikální vyšetření, EKG, krevní obraz, základní biochemie, biochemické vyšetření markerů aterosklerózy (celkový cholesterol, triglyceridy, LDL, HDL, index aterogenity, LP(a) a markerů zánětu (CRP), koagulační parametry). Indikaci k elektivním kardiochirurgickým výkonům zajišťovala II. chirurgická klinika kardiovaskulární chirurgie 1. LF UK a VFN Praha, a též současně zde bylo zajištěno i detailní předoperační klinické vyšetření. Všem pacientům byla ordinována širokospektrá antibiotika, která byla pacientům podána minimálně jeden den před operačním výkonem. Primárním cílem byla náhrada stenotické aortální či mitrální chlopně. Standardně dochází po výkonu k likvidaci odebraného biologického materiálu. Pacienti měli svobodnou volbu další využití odebrané tkáně odmítnout, což se nijak neprojevilo na jejich další léčbě a podepsali informovaný souhlas. V průběhu kardiochirurgického výkonu byla část standardně odebíraného materiálu využita a uložena sterilně do 50 ml zkumavky s fyziologickým roztokem. Poté byla odeslána povolaným pracovníkem k další analýze a zkoumání. Elektivní výkon byl proveden v celkové anestezii. V rámci této studie byla část odstraněného materiálu opatřena anonymizačním kódem. V laboratoři Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha byla chlopeň upravena krájením a byla též zbavena chrupavky. Poté byla zvážena. K izolaci DNA byly použity vzorky o hmotnosti 0,5-1,0 g. Tyto vzorky byly následně zmrazeny na -80 °C. Pro izolaci DNA z chlopní byly použity dva druhy kitů: Blood-Animal-Plant DNA Preparation firmy Jena Bioscience a kit PowerSoil DNA Isolation Kit firmy MO BIO Laboratories přesně dle návodu výrobce. Zde byla ze vzorku izolována celková DNA a byla provedena primární PCR reakce. Takto zpracovaný vzorek byl dále transportován do Mikrobiologického ústavu AV ČR, kde byl

analyzován metodou pyrosekvenování. Se vzorky bylo nakládáno podle pravidel nakládání s biologickým materiálem.

Mikrobiologický ústav AV ČR zajišťoval většinu prací spojených s určením mikrobiálních profilů vzorků DNA izolovaných z dutiny ústní i z chlopňového materiálu. Pro určení mikrobiálních profilů byla použita metoda pyrosekvenování (metoda 454 sekvenování). Tato technika nahradí dříve používanou metodu T-RFLP. Sekvenována je část 16S rDNA. Protože metodika umožňuje délku čtení cca. 400 nukleotidů, musí být oproti předchozím projektům spolupracujících pracovišť vybrán jiný úsek 16S rDNA pro analýzu. Zatímco pro metodu T-RFLP byl amplifikován úsek 16S rDNA dlouhý 780 párů bazí a pokrývající variabilní oblasti I-III, pro techniku pyrosekvenování byl předpokládán výběr kratšího úseku, nejpravděpodobněji úseku IV-VI 16S rDNA. Z toho důvodu byl řešen na počátku projektu nový výběr vhodného úseku a tedy primerů. Optimální primery musí zaručovat jednak dostatečně robustní podmínky k univerzální amplifikaci zvoleného úseku pro všechny významné skupiny mikroorganismů a zároveň umožnit dostatečnou sekvenční variabilitu jednotlivých mikrobiálních druhů. Optimalizace podmínek PCR spočívá v testování různých kombinací primerů s adaptéry (umožňují vazbu na matici pro emulzní PCR při paralelním sekvenování) a rozlišovacími klíči (umožňují odlišení jednotlivých vzorků při paralelním sekvenování). Při vlastní analýze každého vzorku je získán soubor cca. 2-3 tisíc sekvencí úseků 16S rDNA přítomného spektra mikroorganismů. Tyto sekvence jsou analyzovány a na základě podobnosti se sekvencemi v databázi 16S rDNA přiřazeny jednotlivým mikroorganismům nebo skupinám mikroorganismů. Četnost výskytu jednotlivých sekvencí ve vzorku do jisté míry ukáže i kvantitu zastoupení příslušného mikroorganismu. Výsledky pro jednotlivé odběry jsou porovnávány a je posuzována souvislost mikrobiálního osídlení parodontu a chlopňového materiálu.

Tabulka 1 – Vyšetření pacientů před kardiologickým výkonem

číslo pacienta	věk [rok]	pohlaví	kardiovaskulární onemocnění	DM	kuřák/nekuřák	onkologické onemocnění	parodontitis
1	61	M	těsná aortální stenóza	ne	ne	Grawitzův tumor	ano
2	67	M	ICHS, stenóza aortální chlopně s kombinovanou vadou	ne	exnikotinismus	ne	ano
3	61	M	inf. endokarditis na prolabující MI chlopní s regurgitací	ne	exnikotinismus	ne	ano
4	63	F	významná aortální stenóza	ne	ne	ne	ano
5	82	M	ICHS, IM, významná aortální stenóza	ne	exnikotinismus	ca laryngu	ano
6	56	M	mitrální stenóza	ne	ne	ne	ano
7	78	M	aortální stenóza	ne	ne	ne	ano
8	67	M	mitrální regurgitace 3. stupně	DM II. typu	exnikotinismus	ne	ano
9	63	M	aortální vada a fibrilace síní	ne	30 cig. / den	ne	ano
10	62	M	obliterace AII. sin.	ne	exnikotinismus	ne	ano
11	66	M	aortální stenóza	ne	exnikotinismus	ne	ano
12	82	F	těsná aortální stenóza, fibrilace síní	ne	ne	ca rekta	ano
13	68	M	aortální stenóza	DM II. typu	exnikotinismus	ne	ano
14	69	M	těsná aortální stenóza	ne	exnikotinismus	ne	ano
15	69	M	významná aortální stenóza	DM II. typu	exnikotinismus	ne	ano
16	78	M	těsná aortální stenóza	ne	ne	ne	ano
17	51	M	těsná bikuspidální aortální stenóza	ne	ne	ne	ano
18	67	M	těsná aortální stenóza	ne	ne	ne	ano
19	86	F	aortální stenóza	DM I. typu	ne	ne	ano
20	78	F	aortální stenóza	ne	10 cig. / den	ca plic	ano

Věk pacientů se pohyboval mezi 51-86 roky. Do studie bylo zahrnuto 16 mužů a 4 ženy. Tři pacienti měli DM II. typu a jeden DM I. typu. Pouze dva byli aktivními kuřáky, 9 probandů ukončilo chronický nikotinismus před více jak 1 rokem.

U všech probandů byla naměřena PD $\geq 3,5$ mm a ≤ 12 mm. Index BOP byl pozitivní u 100 % probandů.

Pouze jeden proband měl horní celkovou náhradu a 19 probandů zuby v horní i dolní čelisti.

13. Experimentální část II

Metodika

Všichni zařazení pacienti byli vybráni ze skupiny pacientů navštěvujících parodontologické oddělení Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha mezi roky 2014 a 2015 a všichni pacienti byli vyšetřeni na začátku parodontologické léčby. Kritéria pro vstup do studie byla: dobrý celkový zdravotní stav bez chronické medikace, diagnóza chronická či agresivní forma parodontitis, gingivitis či recessus gingivae. Všechna onemocnění parodontu byla klasifikována dle ADA AAP klasifikace [„1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions“]. Pacienti též souhlasili s odběrem kapilární krve pro vyšetření hladiny CRP. Kritéria vylučující vstup do studie byla: systémové onemocnění v anamnéze nebo jiné další onemocnění manifestující se v dutině ústní, probíhající těhotenství či laktace, vysoký krevní tlak, deprese, spánkové obtíže, alkoholismus, nikotinismus a exnikotinismus s ukončením před méně než 10 lety včetně. Všichni pacienti zařazení do této studie byli kavkazského etnika.

Rozdělení pacientů

Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin:

Skupina A: 26 pacientů s agresivní formou parodontitis

Skupina B: 111 pacientů s chronickou formou parodontitis

Skupina C: 13 pacientů s chronickou gingivitis

Skupina D: 8 pacientů s gingiválními recesy

Parodontologická diagnóza byla stanovena na základě detailního klinického vyšetření parodontu a tvrdých zubních tkání. Stav parodontu byl též zhodnocen prostřednictvím rtg intraorálních snímků. Dále byla u všech účastníků studie zaznamenána osobní, stomatologická, rodinná, farmakologická, pracovní, epidemiologická, alergologická anamnéza včetně abúzu nikotinu či jiných návykových látek. Pacienti s gingiválními recesy, jakožto nezáznělivým onemocněním parodontu, tvořili v experimentu kontrolní skupinu.

Studie byla uskutečněna po schválení Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, České republiky. Od všech účastníků studie byl získán písemný informovaný souhlas před vstupem do studie v souladu s Helsinskou deklarací.

Hodnocení parodontu

Skupina A: měla nejméně jeden zub s pozitivním BOP a PD > 5 mm ve všech kvadrantech (vyloučeny byly 3. moláry)

Skupina B: měla nejméně jeden zub s pozitivním BOP a PD > 2 mm ve všech kvadrantech (vyloučeny byly 3. moláry)

Hloubka sondáže (PD) byla hodnocena WHO parodontologickou sondou o délce 11,5 mm metodou "walking probe" na všech zubech. BOP je známkou zánětu a indikuje některé formy destrukce a eroze v oblasti gingiválního sulku [Newman et al., 2012] nebo ulcerace v sulkulárním epitelu. Krev se objevuje po ulceraci spojovacího epitelu.

Skupina C: pro vyšetření byly použity dva indexy: PBI a CAL

Papilla bleeding index (PBI) je index hodnotící stav gingivy, jehož ukazatelem je přítomnost či nepřítomnost krvácení po mírné iritaci interdentální papily WHO sondou. Clinical attachment loss (CAL) je znakem destruktivního onemocnění parodontu. U gingivitis je zánět lokalizovaný na suprakrestální oblast parodontu a vede k ulceracím spojovacího epitelu. Lokality s parodontitis vykazují klinické znaky zánětu gingivy a ztrátu attachmentu, která ukazuje na oddělení kolagenních vláken z povrchu zubního cementu s konkomitantní migrací epiteliálních buněk spojovacího epitelu či epitelu parodontálních chobotů [Armitage, 1995]. Workshop Australské stomatologické společnosti kategorizoval obecná pravidla pro poškození závěsného aparátu zubů na základě klinické ztráty attachmentu, na následující stupně: nepatrné = 1-2 mm, mírné = 3-4 mm, těžké = 5 mm CAL [Highfield, 2009].

V naší studii jsme měřili CAL vždy vestibulárně na každém zubu kalibrovanou sondou University of North Carolina o délce kalibrace 15 mm. Pro statistické zpracování jsme použili nejvyšší hodnotu z horní a dolní čelisti.

Skupina D: pro vyšetření byly použity dva parodontologické indexy: BOP a CAL. Gingivální recesy jsou nezávažným onemocněním parodontu, proto tato skupina pacientů byla použita jako kontrolní skupina vzhledem ke skupinám A, B, C reprezentujícím závažná onemocnění parodontu. Všechna hodnocení stavu parodontu byla provedena dle WHO oral health surveys [WHO, 2013].

Stanovení CRP

Hodnoty CRP (mg/L) byly měřeny z kapilární krve prostřednictvím přístroje Quick Read go wrCRP + Hb (Orion Diagnostica Oy, Finland), který pracuje na principu fotometrie a turbidimetrie. Kapilární krev z prostředního prstu byla odebrána pacientům před klinickým vyšetřením parodontu tenkou kapilárou. Vzorky byly bezprostředně po odběru zpracovány a výsledky zaznamenány. Všichni pacienti byli informováni a souhlasili s odběrem.

Statistická analýza

Pro výpočet deskriptivní statistiky byl použit: medián, standardní odchylka, frekvence a standardní chyba. Tato metoda byla použita k popisu rozdílů mezi skupinami pacientů z hlediska věku, CRP a dalších indexů.

Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Studentův test.

Pro testování lineární závislosti mezi znaky byl vypočten korelační koeficient a grafické znázornění s použitím koeficientu determinace je na obr. 10 a 11.

Hodnota významnosti 0,05 byla použita pro všechny testy.

Pro statistickou analýzu byl použit software MS Excel 2013 a statistický software ToolPak.

14. Experimentální část III

Metodika

Všichni zařazení pacienti byli vybráni ze skupiny pacientů navštěvujících parodontologické oddělení Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN Praha mezi roky 2014 a 2016. Pacienti zařazení do studie byli léčeni konzervativně: deep scaling a root planing. Chirurgické techniky k léčbě agresivní parodontitis nebyly použity. V rámci konzervativní terapie nebyla též použita žádná farmakologická léčba. První odběr kapilární krve pro stanovení hodnoty CRP byl uskutečněn během první návštěvy pacienta v ambulanci (odběr I). Po prvním odběru kapilární krve proběhla instruktáž jednotlivých technik dentální hygieny a odstranění supragingiválního zubního kamene. Za tři měsíce po 1. odběru následovalo subgingivální ošetření (deep scaling a root planing). Druhý odběr vzorků kapilární krve pro stanovení hodnoty CRP následoval šest měsíců po prvním odběru, tzn. tři měsíce po subgingiválním ošetření (odběr II). Poslední odběr kapilární krve pro stanovení hodnoty CRP byl odebrán 12 měsíců po prvním odběru kapilární krve (odběr III). Všichni pacienti byli vyšetřeni na začátku parodontologické léčby a všichni pacienti měli stejnou diagnózu – agresivní forma parodontitis. Kritéria pro vstup do studie byla: dobrý celkový zdravotní stav bez chronické medikace, diagnóza agresivní formy parodontitis. Onemocnění parodontu bylo klasifikováno dle ADA AAP klasifikace [“1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions“], pacienti též souhlasili s odběrem kapilární krve pro vyšetření hladiny CRP. Kritéria vylučující vstup do studie byla: systémové onemocnění v anamnéze nebo jiné další onemocnění manifestující se v dutině ústní, probíhající těhotenství či laktace, vysoký krevní tlak, deprese, spánkové obtíže, alkoholismus, nikotinismus a exnikotinismus s ukončením před méně než 10 lety včetně. Všichni pacienti zařazení do této studie byli kavkazského etnika.

Diagnóza agresivní parodontitis byla potvrzena na základě detailního klinického vyšetření parodontu sestávajícího z měření PD, vyšetření furkačního postižení, viklavosti zubů. Všichni pacienti byli též vyšetřeni radiograficky, byl jim zhotoven OPG snímek a intraorální rentgenové snímky. Kontrolní rentgenové vyšetření bylo zhotoveno v rámci třetího odběru, tzn. 12 měsíců po zahájení léčby. Klinický stav parodontu byl vyšetřen shodně jak u pacientů s agresivní parodontitis, tak i u kontrolní skupiny osob se zdravým parodontem.

Rozdělení pacientů

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin GEN a LOC. Kritérii bylo postižení parodontu charakterizující generalizovanou či lokalizovanou formu agresivní parodontitis dle klasifikace AAP z roku 1999.

Skupina GEN zahrnovala 23 pacientů s generalizovanou formou agresivní parodontitis (36.9±6.2 let; střední věk±SD).

Skupina LOC zahrnovala 22 pacientů s lokalizovanou formou agresivní parodontitis (33.5±7.7 let; střední věk±SD).

Kontrolní skupinu (CON) tvořilo 60 studentů (23.4±1.3 roků; střední věk±SD) třetího ročníku zubního lékařství 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Všechna hodnocení pomocí indexů byla provedena podle WHO oral health surveys [WHO, 2013].

Hodnocení parodontu

Pacienti s agresivní formou parodontitis měli nejméně jeden zub s pozitivním BOP a PD > 5 mm ve všech kvadrantech (vyřazeny byly třetí moláry). PD byla hodnocena WHO sondou o délce kalibrace 11,5 mm technikou "walking probe". Clinical attachment loss (CAL) je známkou destruktivních změn parodontálních tkání a měření bylo prováděno na každém zubu vestibulárně kalibrovanou sondou University of North Carolina Probe o celkové délce kalibrace 15 mm. Pro statistické zhodnocení byla vždy použita nejvyšší a nejnižší hodnota měření v horní a dolní čelisti. Měření byla u každého pacienta provedena v šestiměsíčních intervalech.

Charakter resorpce alveolární kosti byl vyšetřen u všech pacientů radiograficky před začátkem parodontologické léčby. K vyšetření byl použit OPG snímek a rtg status obsahující 12-14 intraorálních rentgenových snímků.

Stanovení CRP je shodné jako v předchozím experimentu.

Statistická analýza

Pro výpočet deskriptivní statistiky byl použit: medián, standardní odchylka, frekvence a standardní chyba. Tato metoda byla použita k popisu rozdílů mezi skupinami pacientů z hlediska věku, CRP a dalších indexů.

Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Studentův a Fisherův test.

Hodnota významnosti 0,05 byla použita pro všechny testy.

Pro statistickou analýzu byly použity statistické programy MS-Excel 2016 a statistický software ToolPak (Microsoft Office Professional Plus 2016, Microsoft, Redmont, WA, USA).

15. Výsledky Experimentální části I

Experimentální část I byla zaměřena na charakterizaci mikrobiomu aortální či mitrální chlopně pacientů s KVO a posouzení možné souvislosti s onemocněním parodontu.

Izolace bakteriální DNA z tkání srdeční chlopně

Zpracování vzorků probíhalo s ohledem na plán chirurgických výkonů u vytipovaných pacientů ve dvou fázích. V první fázi bylo zpracováno osm vzorků (1-8), ve druhé fázi byla metodika na základě získaných zkušeností optimalizována a byly zpracovány čtyři vzorky (9-12). Vzorky 13-20 pak již nebyly zpracovávány z důvodu předčasného ukončení studie.

Pro izolaci DNA ze srdečních chlopní byly v první fázi sekvenování použity z důvodu nízké výtěžnosti dva druhy kitů: Blood-Animal-Plant DNA Preparation firmy Jena Bioscience a kit PowerSoil DNA Isolation Kit firmy MO BIO, Laboratories. Obě metody (oba kity) poskytly DNA v dostatečném množství a kvalitě pro další sekvenování a výsledky sekvenace byly srovnatelné, proto v dalším textu jsou uvedena data s použitím kitu PowerSoil DNA Isolation Kit firmy MO BIO, Laboratories.

Výsledky charakterizace mikrobiomu srdečních chlopní jsou shrnuty v tabulce 2. U vzorků 1-8 lze výsledek interpretovat jen s obtížemi, neboť jak je vidět ve sloupci „nk“ v tabulce 2, převažující bakteriální taxony (*Halomonas phoceae*, *Shewanella haliotis* a *Rubrobacter xylanophilus*) byly identifikovány i ve vzorku negativní kontroly.

Identifikace mikrobiálních taxonů ve vzorku negativní kontroly může mít více důvodů, za nejpravděpodobnější však považujeme kontaminaci použité DNA polymerázy. Komerčně dostupná DNA polymeráza je totiž rekombinantní enzym připravený heterologní expresí v bakteriálních buňkách. Některé šarže enzymu proto mohou obsahovat kontaminaci bakteriální DNA, která může za určitých podmínek ovlivnit výsledky experimentu. V našem případě mohlo k ovlivnění dojít proto, že koncentrace templátové DNA pro sekvenaci (DNA izolované ze vzorků aortálních chlopní) byla příliš nízká. Po přepočtu absolutního počtu identifikovaných taxonů na hodnoty relativní abundance v jednotlivých vzorcích tak tedy mohly taxony

identifikované i v negativní kontrole převážit. Velmi nízká koncentrace templátové DNA pak byla pravděpodobně důsledkem vysoké koncentrace tukové tkáně ve vzorcích z aortálních chlopní, která interferovala s použitou metodou izolace.

Proto byla pro druhou fázi zpracování vzorků (vzorky 9-12) metoda izolace DNA modifikována. Pro vzorky 9-12 byl použit komerční kit PowerSoil DNA Isolation Kit firmy MO BIO, Laboratories a velmi pečlivě byla u těchto vzorků před izolací DNA odstraněna nadbytečná tuková tkáň z chlopně. Jak bylo uvedeno výš, byl pro izolaci DNA testován i další komerční systém Blood-Animal-Plant DNA Preparation firmy Jena Bioscience, přičemž oba systémy poskytovaly srovnatelné výtěžky i kvalitu DNA.

Tabulka 2 – Taxonomické složení mikrobiomu srdečních chlopní pacientů 1-8 (stanovení pravděpodobně zatíženo chybou způsobenou velice nízkou koncentrací templátové DNA a zároveň pravděpodobně kontaminací roztoku použité DNA polymerázy, viz. zjevná kontaminace v negativní kontrole) a 9-12 (optimalizovaná izolace DNA, odpovídající výsledek sekvenace)

číslo pacienta	1	2	3	4	5	6	7	8	nk	9	10	11	12
<i>Halomonas phoceae</i>	24,4	33,6	20	15,4	7,8	44,1	4,5	47,2	56	0	0	0	0
<i>Shewanella haliotis</i>	10,9	18,5	16	6,4	6,4	29,3	2,7	15,1	27,4	0	0	0	0
<i>Rubrobacter xylanophilus</i> Oral Taxon D32	43,3	29,6	12,6	3,1	2	15	2,7	26,5	8,5	0	0	0	0
<i>E. coli</i> Oral Taxon 574	0,2	0,8	0,2	0,5	0	0,8	0,1	0,9	1	0	0	0	0
<i>F. nucleatum</i> ss. <i>vincentii</i> Oral Taxon 200	0,1	0	0,2	3,9	0	0	0	0,1	0,8	28,1	3	22,5	0
<i>P. acnes</i> Oral Taxon 530	4,6	3,9	0,5	0,7	0,1	2,7	2,1	3,6	0,4	2,2	26,8	2,4	7,4
<i>Janibacter</i> sp. Oral Taxon D01	1,1	1,4	1,5	0,3	0	0,7	0,1	0,6	0,4	0	0	0	0
<i>Ralstonia</i> sp. Oral Taxon 027	0,2	0,5	0,5	0,1	0,1	0,5	0	0,3	0,4	1,1	2,4	3,2	0,1
<i>Burkholderia cepacia</i> Oral Taxon 571	0,3	0,1	0,1	0,2	0	0,2	0	0,1	0,4	0,2	0,4	0,6	0,2
<i>Prevotella denticola</i> Oral Taxon 291	0,2	0	0	0,4	0	0	0,1	0	0,3	0	0	2	0,7
<i>Corynebacterium matruchotii</i> Oral Taxon 666	0	0	0	1,2	0	0	0	0	0,3	0	0	0,2	0
<i>P. gingivalis</i> Oral Taxon 619	0,1	0,1	0	50,3	78,6	0,1	75,2	0,1	0,2	13,3	0,2	11,2	2,6
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> Oral Taxon 538	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0,2	0,1	0	0	0
<i>Enterobacter hormaechei</i> Oral Taxon 634	0,3	0,5	0,3	0,4	0,1	0,6	0,1	0,5	0,2	1	0,5	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i> Oral Taxon 469	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0,2	0,2	2,3	0	0,5
<i>Veillonella dispar</i> Oral Taxon 160	0	0	1,1	0,6	0,1	0	0	0	0,1	1	2	1,1	0,9
<i>T. denticola</i> Oral Taxon 584	0	0	0	0,7	0	0	0	0	0,1	4	0,5	0,9	0
<i>Corynebacterium durum</i> Oral Taxon 595	0	0	0	0,3	0	0,1	0	0,2	0,1	0	0	0	0
<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i> Oral Taxon 826	0	0	25,1	0,3	0	0	0	0	0,1	0,3	1	0,8	0,2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Oral Taxon 601	0,7	0,9	0,1	1,3	3,6	0,8	10,3	0	0,1	1,4	0,6	0,6	0,4

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky analýzy mikrobiomu ve 12 vzorcích srdeční chlopně. Pro vzorky 1-8 platí, že výsledky je nutné chápat v kontextu malého výtěžku izolované templátové DNA a pravděpodobné kontaminace roztoku DNA polymerázy. Tři z identifikovaných taxonů (*H. phocea*, *S. haliotis* a *R. xylanophilus*) tedy s největší pravděpodobností pochází z výše zmíněné kontaminace a nízká koncentrace templátové DNA vedla k tomu, že ve vzorcích byly identifikovány pouze ty nejabundantnější taxony. Nicméně, i s těmito omezeními na zřeteli je možné konstatovat, že ve třech případech (4, 5 a 7) bylo ve vzorcích identifikováno značné množství *P. gingivalis*, tedy mikroorganismu, který je jednoznačně asociován s nejtěžšími formami parodontitis.

Z tabulky 2 je dále patrné, že *P. gingivalis* byla identifikována také ve všech čtyřech vzorcích z druhé fáze sekvenování (9-12), tentokrát spolu s dalšími mikroorganismy asociovanými s parodontitis, jako jsou *T. denticola*, *F. nucleatum* nebo *TM7*.

P. acnes, která byla identifikována ve vzorku z aortální chlopně pacienta č. 10 s relativní abundancí téměř 27 %, je aerotolerantní anaerobní bakterií typickou spíše pro kůži člověka a zvířat. Ojediněle ale může způsobovat infekční endokarditis i infekce umělých srdečních chlopní [Günthard et al., 1994, Perry a Lambert, 2014].

Staphylococcus epidermidis byl nalezen u pacienta č. 7 s relativní abundancí 10 %. Tato koaguláza-negativní bakterie se vyskytuje především na kůži člověka a je zodpovědná spolu s dalšími zástupci rodu *Staphylococcus* (především *Staphylococcus aureus*) za infekční endokarditis a je též častým původcem nozokomiálních infekcí [Werdan et al., 2014, Gomes et al., 2014].

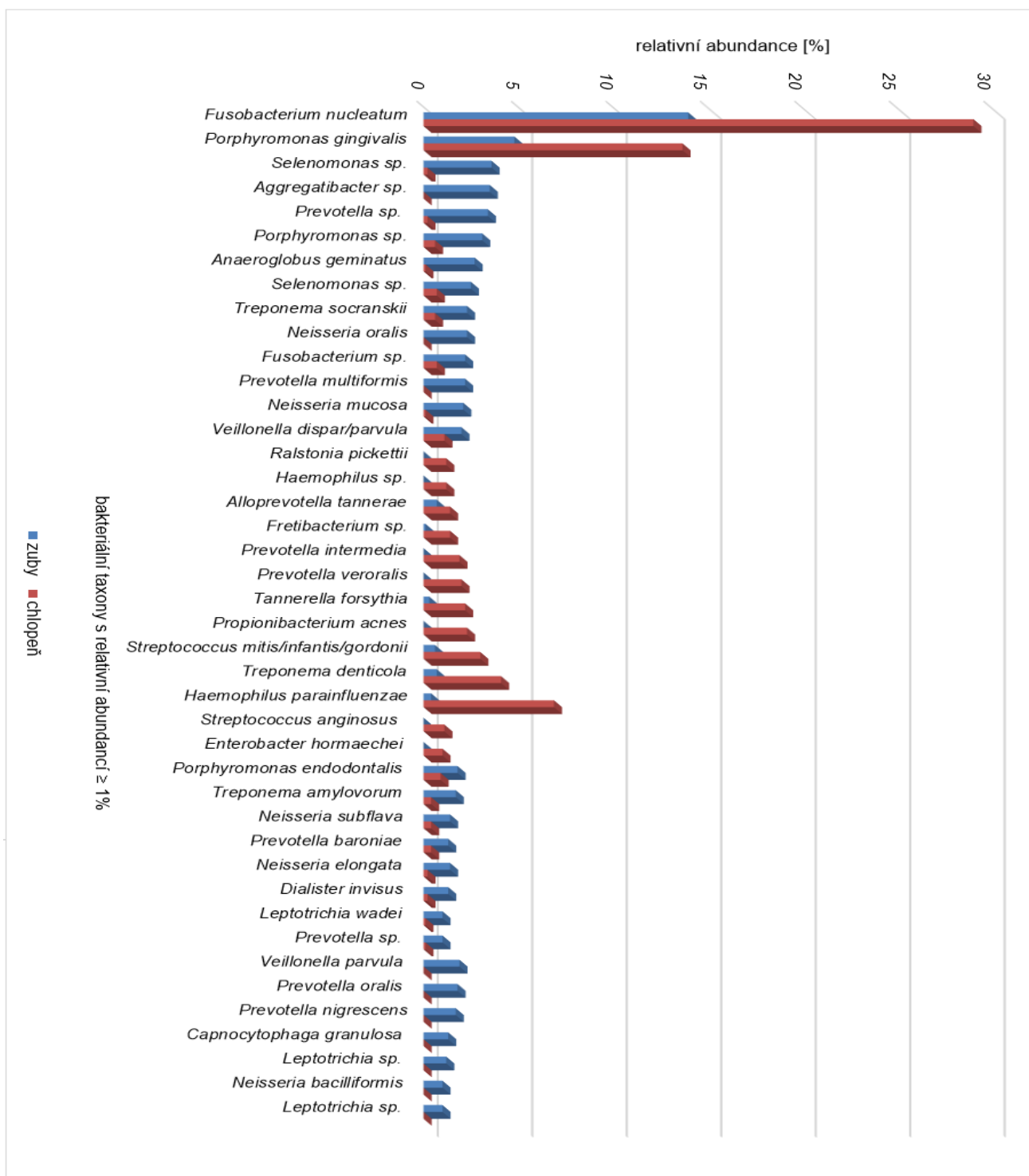
Tabulka 3 – Výsledky parodontologického vyšetření

Číslo pacienta	KPE index [%]	BOP [%]	Postižení furkace	PD max. [mm]
1	36	10	F2	5
2	56	25	0	7
3	47	30	F1	5
4	88	25	F2	10
5	71	81	F3	9
6	50	33	F2	6
7	100	86	0	6
8	16	25	F2	8
9	56	48	F3	7
10	63	100	F2	8
11	44	42	0	10
12	56	50	0	8
13	25	7	0	3
14	31	85	F3	6
15	63	100	0	5
16	82	50	F1	5
17	38	15	F2	7
18	94	100	0	4
19	84	90	F2	7
20	32	89	0	5

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky parodontologického vyšetření všech 20 pacientů, kteří byli zařazeni do studie. Červeně jsou označeni pacienti, u kterých byla ve vzorcích ze srdečních chlopní detekována bakteriální DNA *P. gingivalis* s nejvyšší relativní abundancí v první analýze. Při porovnání stavu parodontu u těchto tří pacientů bylo zjištěno následující: PD 6, 9 a 10 mm, dle klasifikace AAP se jedná o hluboké parodontální choboty, resorpce alveolární kosti postihovala u pacientů č. 4 a 5 v oblasti molárů interradikulární prostor, což bylo hodnoceno jako 2. až 3. stupeň furkačního postižení, proto lze klasifikovat chronickou parodontitis jako pokročilou. U pacienta č. 7 nebyly přítomny vícekořenné zuby, proto je hodnocena resorpce v interradikulárním prostoru jako 0.

Index BOP vyjadřující krvácení po sondáži parodontálních chobotů, tedy jejich zánětlivou aktivitu, byl hodnocen jako velmi vysoký u pacientů s číslem 5 a 7. Zde bylo pozitivní krvácení u více jak 80 % parodontálních chobotů. Jednalo se tedy o aktivně probíhající chronickou parodontitis.

Pokud srovnáváme výsledky charakterizace mikrobiomu aortální chlopně s klinickým parodontologickým vyšetřením pacientů č. 9-12, lze konstatovat, že všichni čtyři pacienti měli neléčenou pokročilou chronickou parodontitis dle klinického parodontologického vyšetření (PD 7-10 mm a BOP index 42-100 %) a u všech čtyř pacientů byly identifikovány periopatogenní bakteriální taxony ve vzorcích srdečních chlopní. U pacientů č. 9, 11 a 12 byla identifikována jako jeden z majoritních taxonů *P. gingivalis*. Asociace tohoto bakteriálního taxonu a parodontitis byla mnohokrát prokázána. Vzorky 13-20 nebyly sekvenovány z důvodu předčasného ukončení studie.

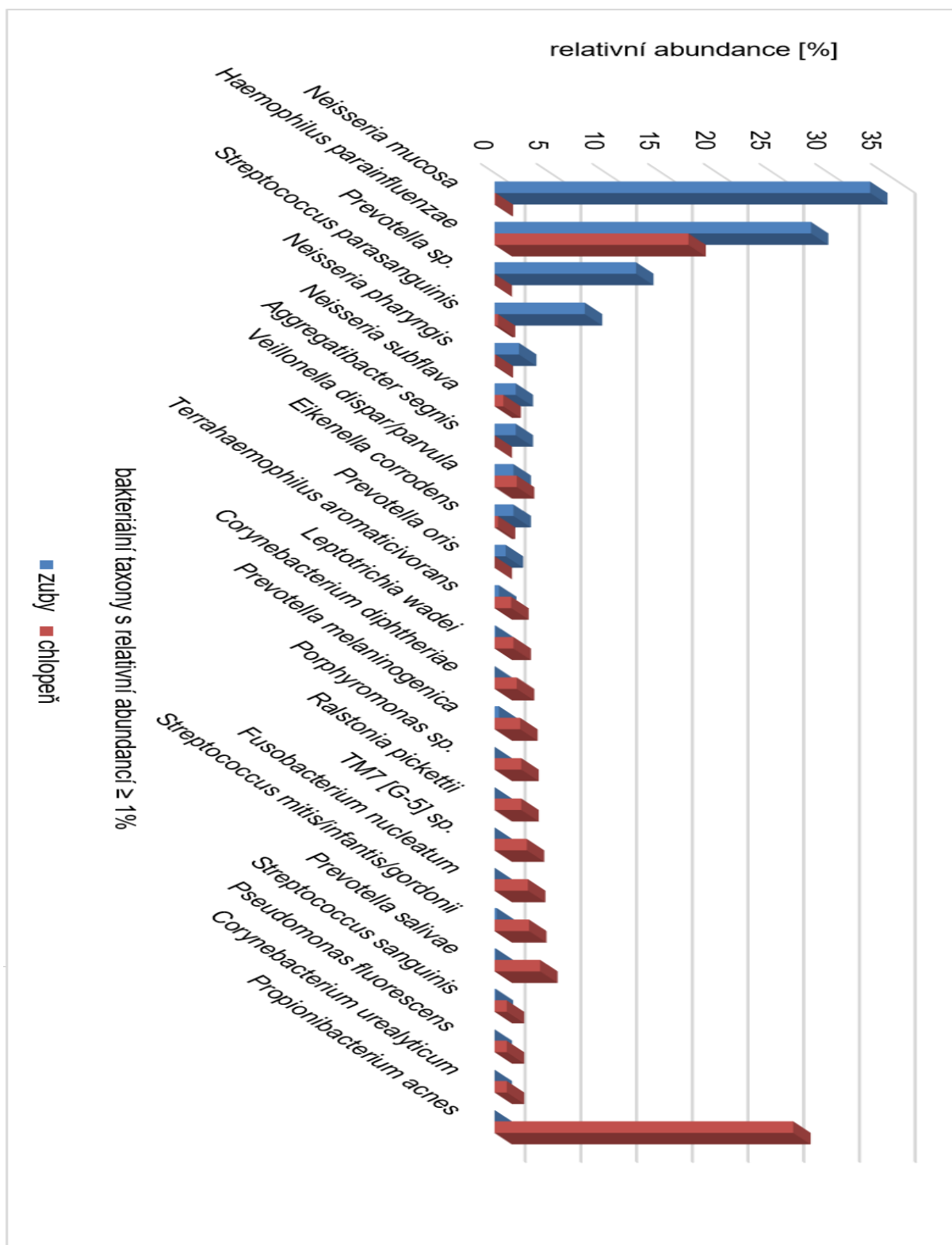


Graf 1 – Porovnání taxonomického složení mikrobiomu srdeční chlopně a parodontálního chobotu u pacienta č. 9.

Ve všech grafech jsou zobrazeny pouze taxony vyskytující se alespoň v jednom ze vzorků s relativní abundancí vyšší než 1 %.

U pacienta č. 9 byly v chlopňovém materiálu identifikovány s nejvyšší relativní abundancí bakteriální taxony: *F. nucleatum* (29,1 %), *P. gingivalis* (13,7 %), *Haemophilus parainfluenzae* (6,9 %) a *T. denticola* (4,1 %). Relativní abundance byla u těchto bakteriálních taxonů vyšší ve tkáni srdeční chlopně než ve vzorcích získaných z parodontálních chobotů.

Ve vzorcích z dutiny ústní byly s nejvyšší relativní abundancí identifikovány tyto bakteriální taxony: *F. nucleatum* (14 %), *P. gingivalis* (4,8 %), *Selenomonas sp.* (3,6 %) a *Aggregatibacter sp.* (3,5 %).



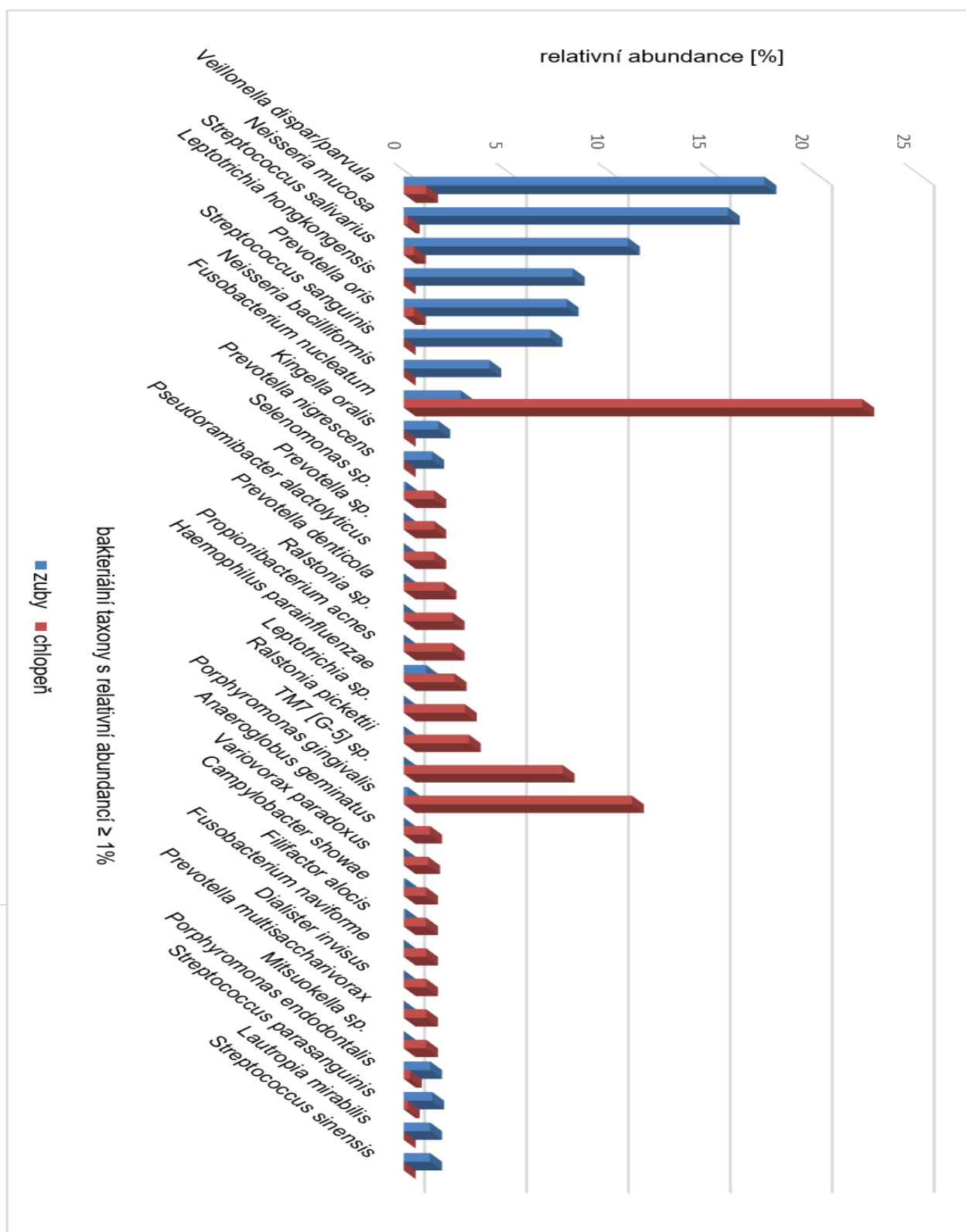
Graf 2 – Porovnání taxonomického složení mikrobiomu srdeční chlopně a parodontálního chobotu u pacienta č. 10.

Ve všech grafech jsou zobrazeny pouze taxony vyskytující se alespoň v jednom ze vzorků s relativní abundancí vyšší než 1 %.

U pacienta č. 10 byly v chlopňovém materiálu identifikovány s nejvyšší relativní abundancí bakteriální taxony: *P. acnes* (26,8 %), *H. parainfluenzae* (17,4 %) a *Prevotella salivae* (4,1 %).

Ve vzorcích z dutiny ústní byly identifikovány s nejvyšší relativní abundancí tyto bakteriální taxony: *Neisseria mucosa* (33,7 %), *H. parainfluenzae* (28,4 %) a *Prevotella sp.* (12,7 %).

U pacienta č. 10 odpovídá zastoupení jednotlivých taxonů spíše zdravému parodontu. Typické periopatogenní bakterie byly identifikovány s nízkou relativní abundancí: *F. nucleatum* 3 %, *TM7 [G-5] sp.* 2,9 % a *E. corrodens* 1,7 %.

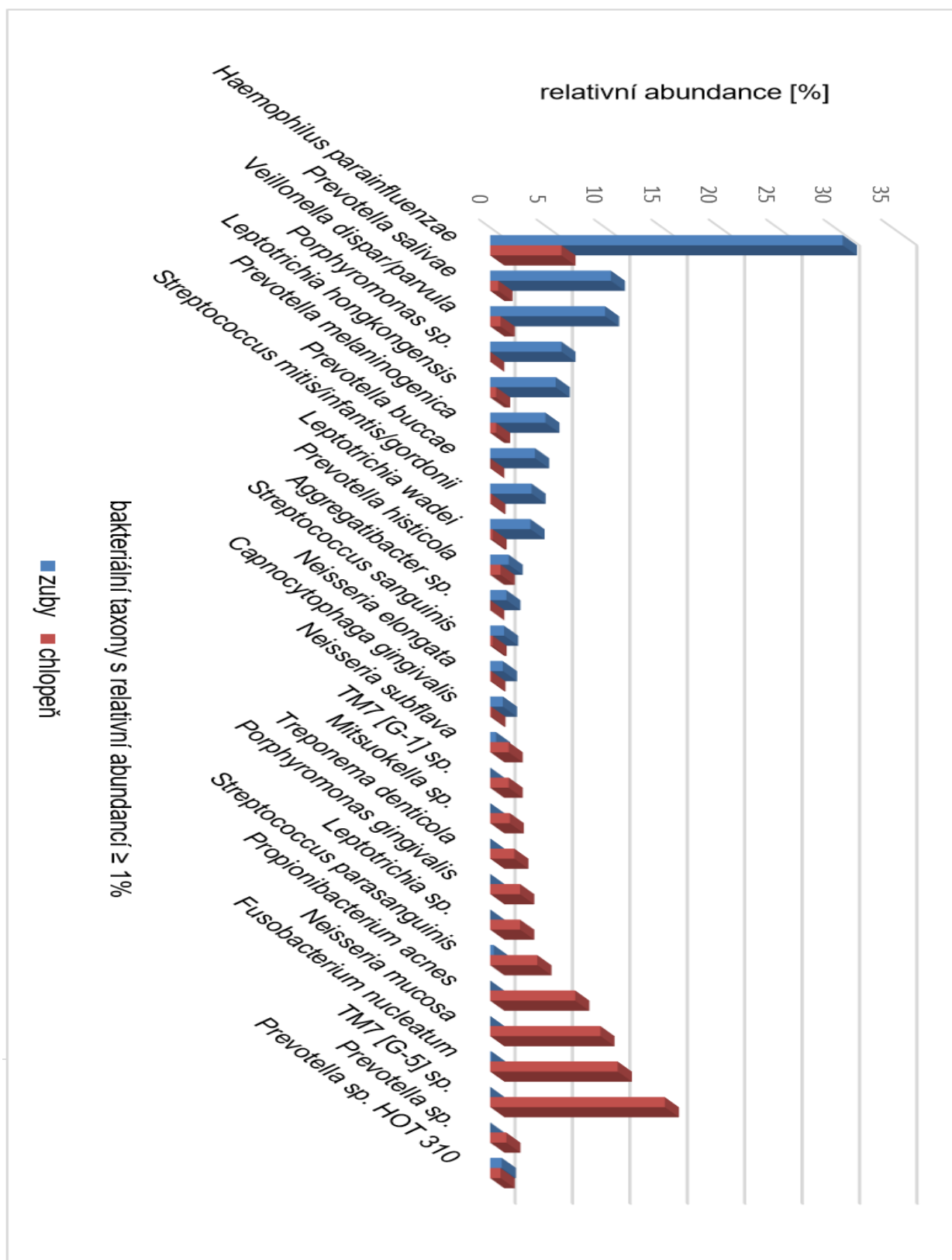


Graf 3 – Porovnání taxonomického složení mikrobiomu srdeční chlopně a parodontálního chobotu u pacienta č. 11.

Ve všech grafech jsou zobrazeny pouze taxony vyskytující se alespoň v jednom ze vzorků s relativní abundancí vyšší než 1 %.

U pacienta č. 11 byly v chlopňovém materiálu identifikovány s nejvyšší relativní abundancí tyto bakteriální taxony: *F. nucleatum* (22,5 %), *P. gingivalis* (11,2 %), *TM7 [G-5] sp.* (7,8 %).

Ve vzorcích z dutiny ústní byly identifikovány s nejvyšší relativní abundancí tyto bakteriální taxony: *Veillonella dispar* (17,7 %), *N. mucosa* (15,9 %), *Streptococcus salivarius* (11,0 %) a *Leptotrichia hongkongensis* (8,3 %).



Graf 4 – Porovnání taxonomického složení mikrobiomu srdeční chlopně a parodontálního chobotu u pacienta č. 12.

Ve všech grafech jsou zobrazeny pouze taxony vyskytující se alespoň v jednom ze vzorků s relativní abundancí vyšší než 1 %.

U pacienta č. 12 byly v chlopňovém materiálu identifikovány s nejvyšší relativní abundancí tyto bakteriální taxony: *TM7 [G-5] sp.* (15,2 %), *F. nucleatum* (11,1 %), *N. mucosa* (9,6 %), *P. acnes* (7,4 %), *H. parainfluenzae* (6,2 %).

Ve vzorcích z dutiny ústní byly identifikovány s nejvyšší relativní abundancí tyto bakteriální taxony: *H. parainfluenzae* (30,7 %), *Prevotella salivae* (10,5 %), *Veillonella dispar* (10 %), *Porphyromonas sp.* (6,2 %) a *Leptotrichia hongkongensis* (5,7 %).

Grafy 1-4 znázorňují výsledky druhého sekvenování bakteriální DNA ze vzorků pocházejících z dutiny ústní a z chlopňového materiálu u čtyřech pacientů (9-12). Lze konstatovat, že mikrobiomy se vzájemně nepřekrývají, nicméně některé taxony identifikované v dutině ústní byly nalezeny i v materiálu srdečních chlopní. Na takto malém počtu vzorků ovšem nelze definovat příčinnou souvislost.

Zhodnocení Experimentální části I

Pilotní studie, jejíž výsledky jsou prezentovány v Experimentální části I, byla z důvodu nedostatku finančních prostředků na experimentální analýzy předčasně ukončena. Zpracován je tedy jen výběr odebraných vzorků a ke zpracování dalších, ani k rozšíření skupiny probandů o pacienty s KVO bez parodontitis a s parodontitis bez KVO, u kterých by z obecně medicínských i etických důvodů nebylo možné zajistit chlopňový materiál, se již s ohledem na financování (u partnera projektu MBU AV) nepřistoupilo.

Jak bylo řečeno výše, interpretace výsledků charakterizace mikrobiomu z chlopní je s ohledem na pravděpodobnou kontaminaci a nízký počet vzorků obtížná. Jednu skutečnost ovšem lze konstatovat s jistotou – ve třech případech byla jako naprosto převažující taxon identifikována *P. gingivalis*, což je patogen jednoznačně spojovaný s parodontálním onemocněním. Ve všech případech se jednalo o pacienty s hlubokými a exsudujícími parodontálními choboty, jejichž hloubka se pohybovala v rozmezí 6-10 mm. Jednalo se tedy o pacienty s neléčenou pokročilou parodontitis chronica.

16. Výsledky Experimentální části II

Stanovení C reaktivního proteinu ve vzorku kapilární krve u pacientů s parodontopatií (gingivitis chronica, parodontitis aggressiva, parodontitis chronica, recessus gingivae).

Všechny charakteristiky pacientů jsou sumarizovány v tabulce 4 a statistické srovnání klinických parametrů a CRP hodnot jsou sumarizovány v tabulce 6.

Charakteristiky testovaných souborů – statistické zhodnocení

Tabulka 4 – Charakteristiky testovaných souborů

	N	Ženy(F) Muži (M)	Medián věku ± SD	
Skupina A Parodontitis aggressiva	26	F 13 M 13	36,6 ± 7 38,4 ± 7,4	37,5 ± 7,4
Skupina B Parodontitis chronica	111	F 65 M 45	57 ± 11,3 52,4 ± 11	55,1 ± 11,4
Skupina C Gingivitis chronica	13	F 10 M 3	41 ± 13,1 33 ± 4,4	39,2 ± 12
Skupina D Recessus gingivae	8	F 3 M 5	53 ± 8,9 39 ± 7,4	44,3 ± 10,3

Tabulka 5 – Hodnoty CRP a klinických parametrů u všech testovaných souborů

skupina	počty	CRP [mg/L]	BOP [%]	PD [mm]	PBI	CAL [mm]
A	26	2,8 (±2,4)	23,5 (±27,8)	5,7 (±2,7)		
B	111	2,2 (±2,0)	31,8 (±30,2)	5,2 (±2,3)		
C	13	2,1 (±1,7)			1,2 (±1,3)	1,9 (±1,8)
D	8	1,3 (±0,7)	0,5 (±1,1)			4,0 (±1,5)

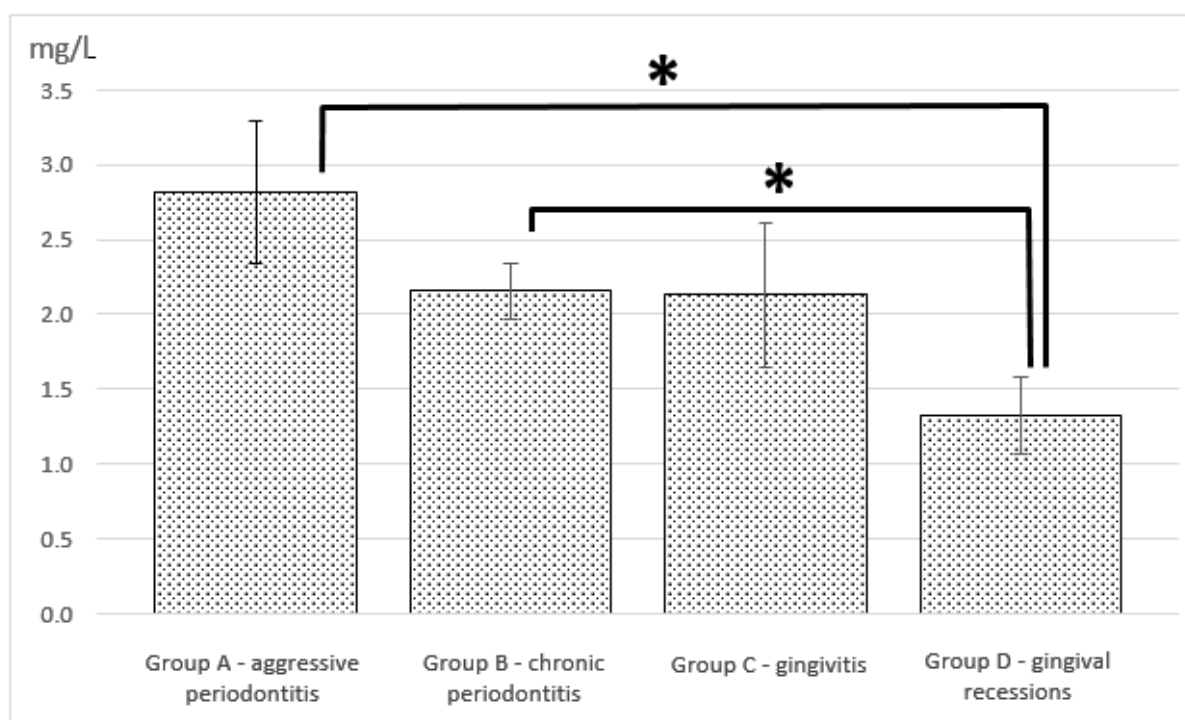
Ve skupině A byla průměrná hodnota BOP indexu $23,5 \pm 27,8$ % (průměr \pm SD) a hodnota PD byla $5,7 \pm 2,7$ mm (průměr \pm SD).

Ve skupině B byl průměr BOP indexu $31,8 \pm 30,2$ % (průměr \pm SD) a průměr PD byl $5,2 \pm 2,3$ mm (průměr \pm SD).

Ve skupině C byl průměr PBI indexu $1,2 \pm 1,3$ (průměr \pm SD) a průměr CAL byl $1,9 \pm 1,8$ mm (průměr \pm SD).

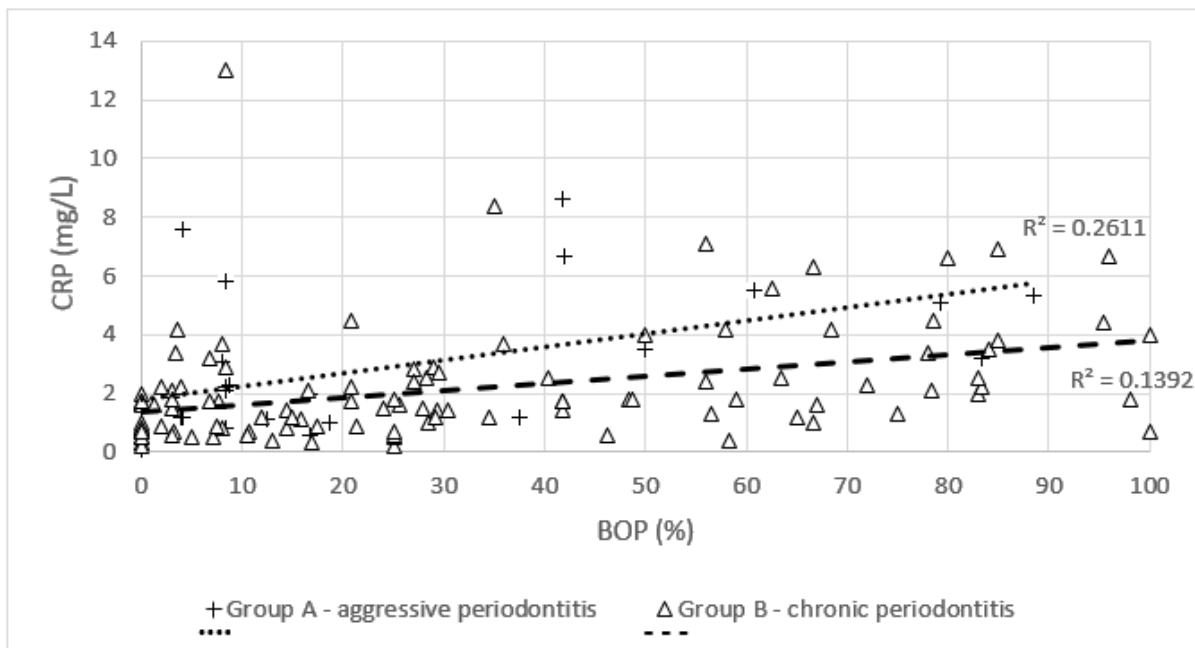
Ve skupině D byla hodnota BOP indexu $0,5 \pm 1,1$ % (průměr \pm SD) a hodnota CAL byla $4,0 \pm 1,5$ mm (průměr \pm SD).

Hodnoty CRP ve skupině pacientů A ($2,8 \pm 2,4$ mg/L, průměr \pm SE), ve skupině pacientů B ($2,2 \pm 2,0$ mg/L, průměr \pm SE), ve skupině pacientů C ($2,1 \pm 1,7$ mg/L, průměr \pm SE) a ve skupině pacientů D ($1,3 \pm 0,7$ mg/L, průměr \pm SE). Výsledky hodnot CRP ve všech testovaných skupinách jsou graficky znázorněny na obrázku 9. Statisticky signifikantní rozdíly byly zjištěny mezi skupinami A a D ($p = 0,01$) a mezi skupinami B a D ($p = 0,02$).



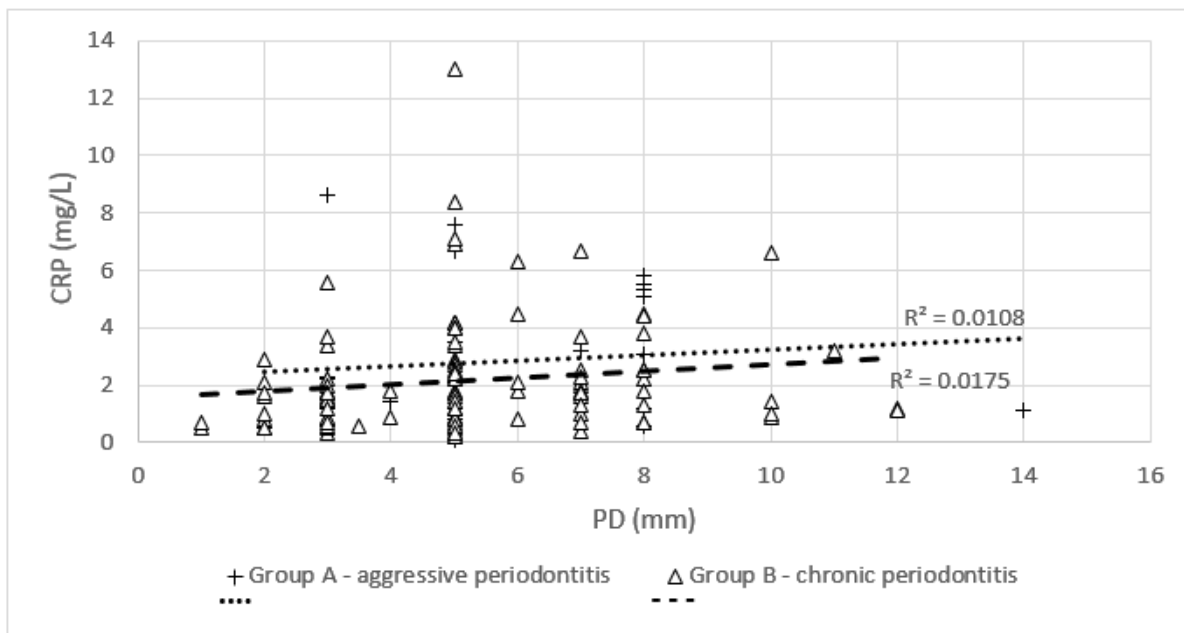
Obrázek 9 – Hodnoty CRP

Statistické korelace mezi BOP a hodnotami CRP mezi skupinami A a B jsou zobrazeny na obrázku 10. Lineární závislost ve skupině A (koeficient determinace 0,2611) byla vyšší než ve skupině B (koeficient determinace 0,1392).



Obrázek 10 – Statistické korelace mezi hodnotami BOP a CRP mezi skupinami A a B (R^2 koeficient determinace)

Statistické korelace mezi hodnotami PD a CRP mezi skupinami A a B jsou zobrazeny na obrázku 11. Lineární závislost byla nízká ve skupině A (koeficient determinace 0,0108) stejně jako ve skupině B (koeficient determinace 0,0175)



Obrázek 11 – Statistické korelace mezi hodnotami PD a CRP mezi skupinami A a B (R^2 koeficient determinace)

Tabulka 6 – Statistická srovnání klinických parametrů a hodnot CRP u všech testovaných souborů (R^2 koeficient determinace)

	R^2	Pearson	p value
A – PD, CRP	0,011	0,1039	0,6132
A – BOP, CRP	0,261	0,511	0,0076
B – PD, CRP	0,018	0,1323	0,1686
B – BOP, CRP	0,139	0,3731	0,0001
C – PBI, CRP	0,383	0,619	0,0241
C – CAL, CRP	0,321	0,5667	0,0434
D – CAL, CRP	0,008	0,0889	0,8346
D – BOP, CRP	0,252	0,5016	0,2053

Hodnoty PD, BOP, PBI, CAL a CRP měřeny ve skupinách pacientů A, B, C, D.

17. Výsledky Experimentální části III

Tabulka 7 – Hodnoty CRP a klinických parodontálních parametrů ve všech testovaných skupinách

	VĚK	CRP I [mg/L]	CRP II [mg/L]	CRP III [mg/L]	BOP I [%]	BOP II [%]	BOP III [%]	PD I [mm]	PD II [mm]	PD III [mm]	CAL I [mm]	CAL II [mm]	CAL III [mm]	
GEN	Průměr	36.9	4.1	4.2	3.1	36.8	19.8	6.8	6.9	5.1	4.2	8.9	9.0	9.7
	SD	6.2	4.1	4.6	3.3	32.4	26.4	11.9	2.4	3.1	2.7	2.3	2.4	2.7
LOC	Průměr	33.5	2.6	1.7	1.3	30.4	16.5	10.0	7.5	5.4	4.4	8.4	7.4	7.7
	SD	7.7	2.4	1.4	1.7	25.4	17.0	18.2	3.1	2.1	2.1	3.4	3.6	3.9
CON	Průměr	23.4		1.9			4.6			1.5			2.0	
	SD	1.3		2.3			8.1			0.7			1.2	

CRP I-III: 1. až 3. odběr kapilární krve pro stanovení CRP

BOP I-III: hodnota BOP při 1. až 3. odběru kapilární krve pro stanovení CRP

PD I-III: hodnota PD při 1. až 3. odběru kapilární krve pro stanovení CRP

CAL I-III: hodnota CAL při 1. až 3. odběru kapilární krve pro stanovení CRP

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CON: kontrolní skupina, CRP: C reaktivní protein, GEN: skupina pacientů s generalizovanou formou agresivní parodontitis, LOC: skupina pacientů s lokalizovanou formou agresivní parodontitis, PD: pocket depth, SD: standardní odchylka

Tabulka 8 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů ve skupinách pacientů GEN, LOC a GEN+LOC s kontrolní skupinou mezi jednotlivými fázemi parodontologické léčby

	Skupina	I vs. CON (p)	II vs. CON (p)	III vs. CON (p)
CRP	GEN	0.018*	0.000*	0.030*
	LOC	0.239	0.000*	0.610
	GEN+LOC	0.014*	0.000*	0.092
BOP	GEN	0.000*	0.012*	0.416
	LOC	0.000*	0.004*	0.194
	GEN+LOC	0.000*	0.000*	0.137
PD	GEN	0.000*	0.000*	0.000*
	LOC	0.000*	0.000*	0.000*
	GEN+LOC	0.000*	0.000*	0.000*
CAL	GEN	0.000*	0.000*	0.000*
	LOC	0.000*	0.000*	0.000*
	GEN+LOC	0.000*	0.000*	0.000*

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

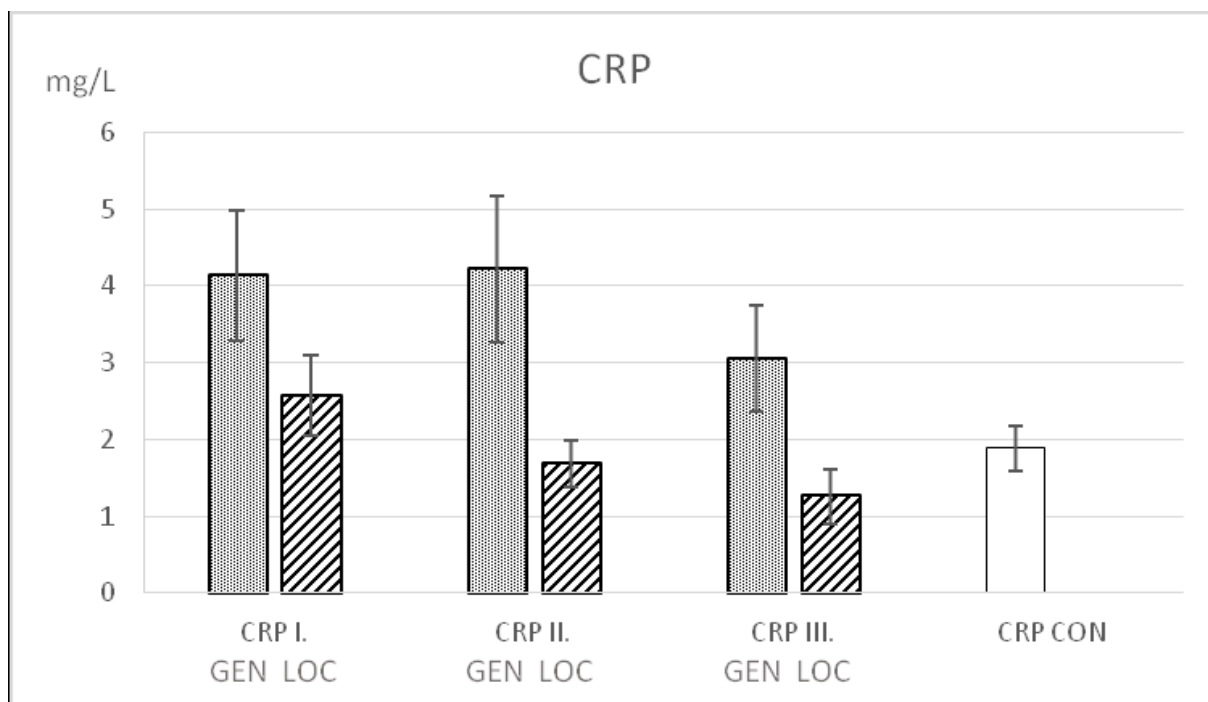
BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein PD: pocket depth

Tabulka 9 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů ve skupinách pacientů GEN, LOC a GEN+LOC mezi jednotlivými fázemi parodontologické léčby

	Skupina	I vs. II (p)	II vs. III (p)	I vs. III (p)
CRP	GEN	0.922	0.071	0.216
	LOC	0.043*	0.140	0.024*
	GEN+LOC	0.389	0.023*	0.022*
BOP	GEN	0.017*	0.005*	0.000*
	LOC	0.002*	0.030*	0.001*
	GEN+LOC	0.000*	0.000*	0.000*
PD	GEN	0.000*	0.018*	0.000*
	LOC	0.001*	0.035*	0.000*
	GEN+LOC	0.000*	0.001*	0.000*
CAL	GEN	0.840	0.002*	0.022*
	LOC	0.090	0.248	0.287
	GEN+LOC	0.130	0.002*	0.862

* Statisticky signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$)

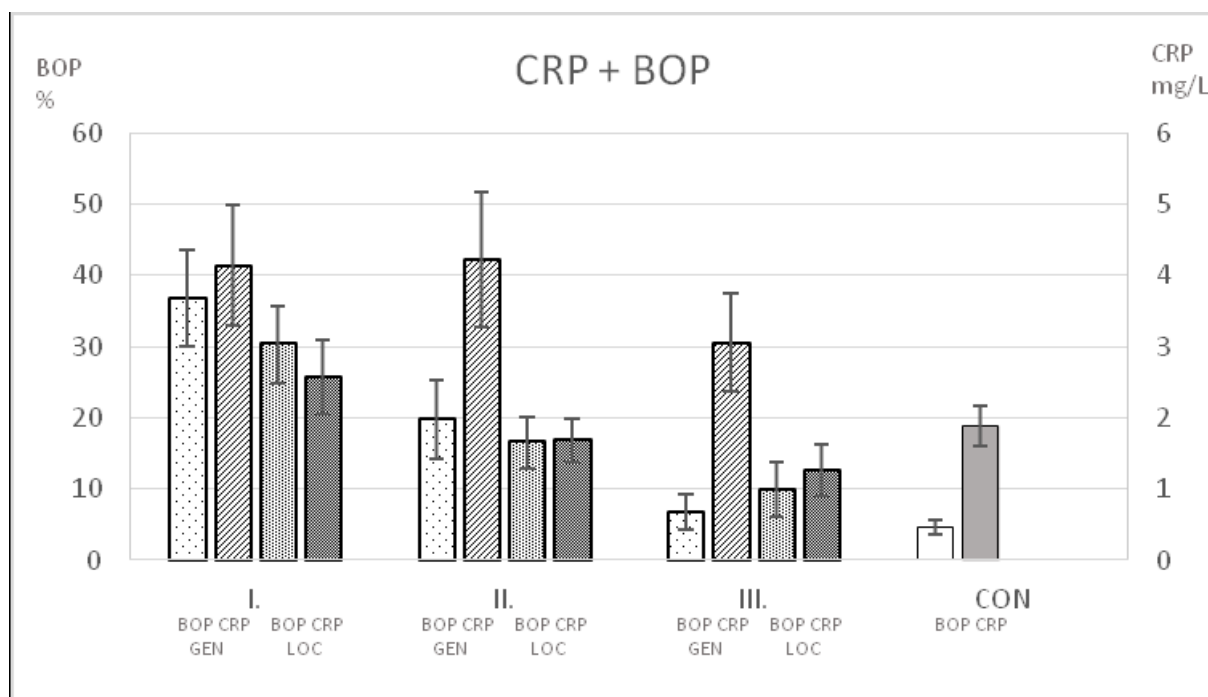
BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein PD: pocket depth



Obrázek 12 – Hodnoty CRP

Hodnoty CRP u skupin pacientů GEN a LOC a kontrolní skupiny CON, které ukazuje tabulka 7.

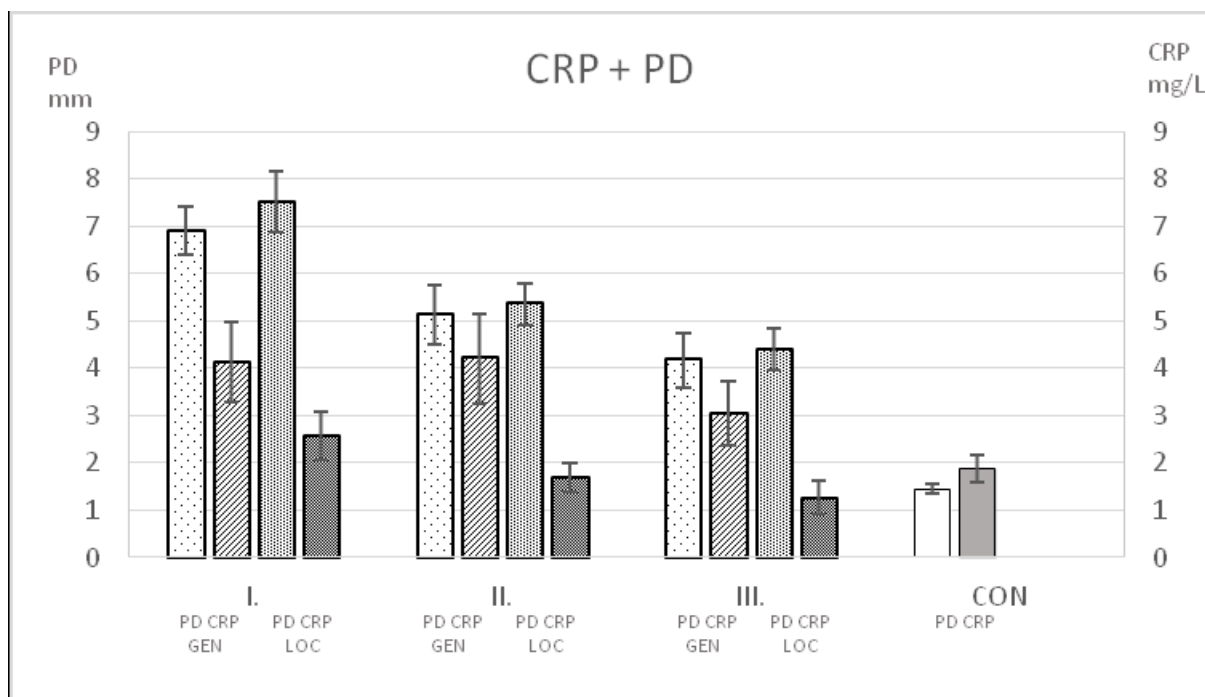
V obou skupinách (GEN a LOC) klesaly hodnoty CRP během parodontologické léčby, ve skupině GEN ze $4,1 \pm 4,1$ mg/L na $3,1 \pm 3,3$ mg/L a ve skupině LOC z $2,6 \pm 2,1$ mg/L na $1,3 \pm 2,7$ mg/L. Hodnota CRP v kontrolní skupině byla $1,9 \pm 2,3$ mg/L.



Obrázek 13 – CRP a BOP index v jednotlivých fázích parodontologické léčby

Hodnoty CRP a indexu BOP v obou skupinách (GEN a LOC) a v kontrolní skupině CON. V obou skupinách (GEN a LOC) klesal BOP index během parodontologické léčby.

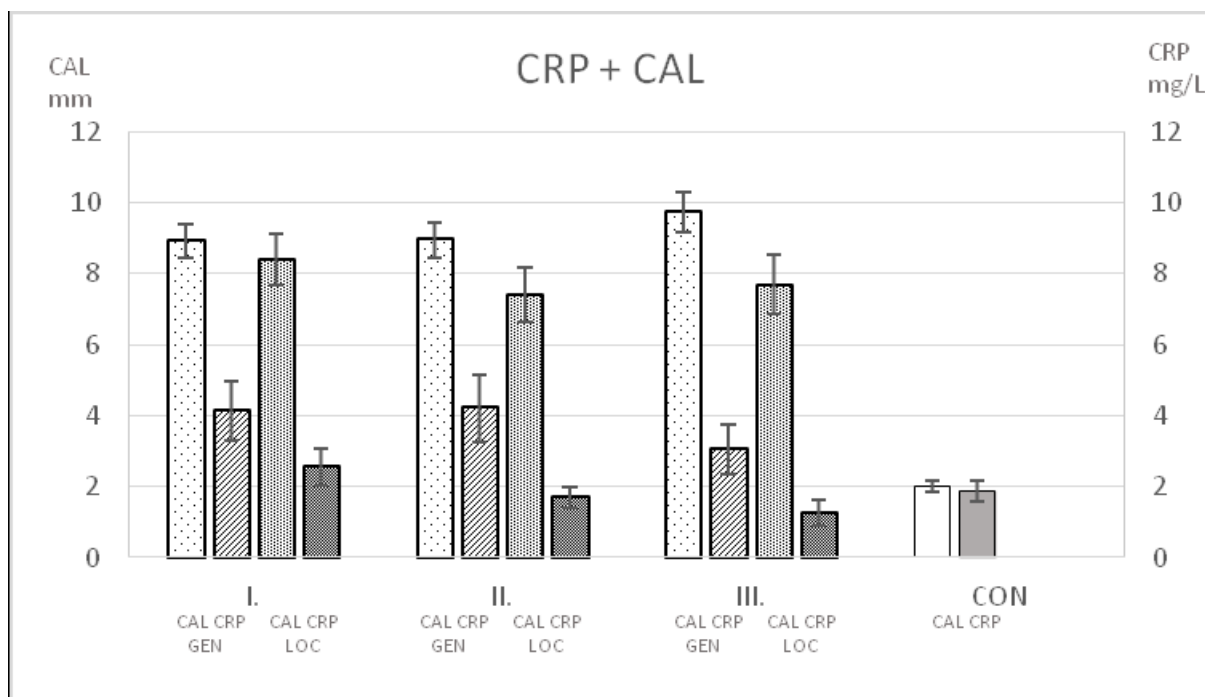
Ve skupině GEN z $36,8 \pm 32,4$ % na $6,8 \pm 11,9$ % a ve skupině LOC z $30,4 \pm 25,4$ % na $10,0 \pm 18,2$ %. BOP index v kontrolní skupině byl $4,6 \pm 8,1$ %.



Obrázek 14 – Hodnoty CRP a PD v jednotlivých fázích parodontologické léčby

Hodnoty CRP a PD u pacientů ze skupin GEN, LOC a CON v průběhu parodontologické léčby.

V obou vyšetřovaných skupinách pacientů s parodontitis (GEN a LOC) klesaly hodnoty PD, ve skupině GEN z $6,9 \pm 2,4$ mm na $4,2 \pm 2,7$ mm a ve skupině LOC z $7,5 \pm 3,1$ mm na $4,4 \pm 2,1$ mm. Index PD v kontrolní skupině byl $1,5 \pm 0,7$ mm.



Obrázek 15 – Hodnoty CRP a CAL ve fázích parodontologické léčby.

Hodnoty CRP a CAL u pacientů ze skupin GEN a LOC v průběhu parodontologické léčby a v kontrolní skupině CON.

CAL index se zvýšil v průběhu parodontologické léčby ve skupině pacientů GEN z 8.9 ± 2.3 mm na 9.7 ± 2.7 mm a v LOC se tento index snížil v průběhu parodontologické léčby z 8.4 ± 3.4 mm na 7.7 ± 3.9 mm. CAL index v kontrolní skupině CON byl 2.0 ± 1.2 mm.

Tabulka 10 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů mezi jednotlivými fázemi parodontologické léčby ve skupině pacientů GEN

	I vs. II	II vs. III	I vs. III
CRP	0.922	0.071	0.216
BOP	0.017*	0.005*	0.000*
PD	0.000*	0.018*	0.000*
CAL	0.840	0.002*	0.022*

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) byly zjištěny mezi všemi fázemi parodontologické léčby u BOP a PD. U hodnoty CAL byly statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) zjištěny mezi II. a III. a dále mezi I. a III. měřením. Tento výsledek koresponduje s apikálním posunem attachmentu po instrumentálním ošetření povrchu radixů zubů, který by měl být při správném a šetrném použití nástrojů (kyret) minimální.

Tabulka 11 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů mezi jednotlivými fázemi parodontologické léčby ve všech skupinách pacientů (GEN i LOC dohromady)

	I vs. II	II vs. III	I vs. III
CRP	0.389	0.023*	0.022*
BOP	0.000*	0.000*	0.000*
PD	0.000*	0.001*	0.000*
CAL	0.130	0.002*	0.862

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) byly zjištěny mezi všemi fázemi parodontologické léčby u BOP a PD a mezi hodnotami CRP, které byly změřeny při I. a II. a také I. a III. odběru kapilární krve.

Tabulka 12 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů mezi jednotlivými fázemi parodontologické léčby ve skupině pacientů LOC

	I vs. II	II vs. III	I vs. III
CRP	0.043*	0.140	0.024*
BOP	0.002*	0.030*	0.001*
PD	0.001*	0.035*	0.000*
CAL	0.090	0.248	0.287

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) byly zjištěny mezi všemi fázemi parodontologické léčby u BOP a PD a mezi hodnotami CRP, které byly změřeny při II. a III. a také při I. a III. odběru kapilární krve a mezi II. a III. měřením CAL.

Tabulka 13 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů v jednotlivých fázích parodontologické léčby mezi skupinou pacientů GEN a kontrolní skupinou CON

	I vs. CON	II vs. CON	III vs. CON
CRP	0.018*	0.000*	0.030*
BOP	0.000*	0.012*	0.416
PD	0.000*	0.000*	0.000*
CAL	0.000*	0.000*	0.000*

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) byly zjištěny mezi všemi fázemi parodontologické léčby u GEN a CON skupiny v hodnotách CRP a u PD a CAL indexů. Mezi hodnotami BOP v I. a II. měření u GEN a CON skupiny byly též zjištěny signifikantní rozdíly, což odpovídá hojení aktivních parodontálních chobotů po instrumentálním ošetření povrchu kořene. Je zajímavé, že mezi I. a III. měření nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v BOP. Toto by mohlo ukazovat na postupný relaps zánětlivého procesu ve tkáních parodontu.

Tabulka 14 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů v jednotlivých fázích parodontologické léčby mezi skupinou pacientů LOC a kontrolní skupinou

CON			
	I vs. CON	II vs. CON	III vs. CON
CRP	0.239	0.000*	0.610
BOP	0.000*	0.004*	0.194
PD	0.000*	0.000*	0.000*
CAL	0.000*	0.000*	0.000*

* Statisticky signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíl ($p=0,05$) byly zjištěny mezi všemi fázemi parodontologické léčby mezi LOC a CON skupinou v hodnotách PD a CAL indexů, mezi hodnotami BOP v měřeních I a II a mezi hodnotami CRP ve fázi II mezi LOC a CON skupinou.

Tabulka 15 – Statistické porovnání hodnot CRP a klinických parodontálních parametrů v jednotlivých fázích parodontologické léčby mezi všemi pacienty (skupiny GEN a LOC dohromady) a kontrolní skupinou CON

	I vs. CON	II vs. CON	III vs. CON
CRP	0.014*	0.000*	0.092
BOP	0.000*	0.000*	0.137
PD	0.000*	0.000*	0.000*
CAL	0.000*	0.000*	0.000*

* Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$)

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CRP: C reaktivní protein, PD: pocket depth

Statisticky signifikantní rozdíly ($p=0,05$) hodnot CRP a PD byly nalezeny mezi všemi fázemi parodontologické léčby, mezi hodnotami BOP indexu v měřeních I a II a mezi hodnotami CRP v měřeních I a II.

18. Diskuse

KVO jsou převážně zánětlivá onemocnění, v jejichž etiologii se mohou uplatňovat i bakterie osidlující struktury dutiny ústní. Studií, které dokumentují identifikaci orálních bakterií nebo jejich produktů ve tkáních kardiovaskulárního systému, je mnoho. Kariézní léze, gingivální sulkus či parodontální tkáň jsou možnými cestami průniku bakterií do krevního oběhu, kterým se následně bakterie či jejich produkty dostávají do cévní stěny, tkáň srdeční chlopně, endokardu či dalších struktur kardiovaskulárního systému. Jakým mechanismem bakterie nebo jejich produkty ovlivňují buňky tkání KVS je předmětem současného výzkumu v této problematice.

Z různých lokalit KVS byla identifikována nejrůznější infekční agens, která se do krevního oběhu mohou dostat při provádění běžné ústní hygieny a žvýkání [Maharaj et al., 2012, Lockhart et al., 2008], po ošetření parodontu scalingem [Forner et al., 2006] či chirurgických výkonech v dutině ústní [Reis et al., 2018]. Velice často se jedná o typické nepatogenní orální bakterie jako například čeled' Enterobacteriaceae, kam řadíme *E. coli*, *Klebsiella spp.* a *Enterobacter aerogenes*; dále bakteriální taxony spojované s různými patogenitami v dutině ústní, nejčastěji se zubním kazem (*Streptococcus spp.*, *Lactobacillus salivarius*) [Jie et al., 2017, Nakano et al., 2009, Krishnan et al., 2017], halitózou *Solobacterium moorei* [Haraszthy et al., 2008] a *Atopobium parvulum* [Copeland et al., 2009] a onemocněním parodontu [Chalupova et al., 2018, Moreno et al., 2017, Aoyama et al., 2018, Mougeot et al., 2017]. Orální bakterie byly nejprve identifikovány ve vzorcích krve při bakteriemii staršími kultivačními metodami, jejichž technologická omezení umožnila identifikovat pouze kultivovatelné taxony, tedy převážně aerobní druhy. Některé anaerobní druhy (například *Clostridium sporogenes*, *F. nucleatum* aj.) byly identifikovány ze vzorků krve u pacientů se suspektní endokarditis [Felner a Dowell, 1970]. Ze srdečních chlopní byly též izolovány glykopeptidy s některými vlastnostmi polysacharidů *Streptococcus haemolyticus skupiny A* [Goldstein et al., 1968]. V 90. letech 20. století byly s rozvojem pokročilejších molekulárních metod identifikovány kromě již dříve kultivovatelných streptokoků a stafylokoků i další bakteriální taxony, mezi které patří např. *Bartonella quintana* [Jalava et al., 1995], *Tropheryma whippelii* [Goldenberger et al., 1997] aj. V pozdějších letech byly díky využití molekulárních metod (PCR, hybridizace) identifikovány i obtížně kultivovatelné (nebo nekultivovatelné) bakteriální

taxony jako např. *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* aj. [Haraszthy et al., 2000, Okuda et al., 2001, Stelzel et al., 2002, Fiehn et al., 2005]. V posledních letech se využívají k identifikaci bakterií ve tkáních KVS stále častěji high throughput sekvenační metody, které identifikovaly ve tkáních KVS bakteriální taxony asociované jak se zdravými tkáněmi parodontu (*Haemophilus parainfluenzae*, rody *Streptococcus*, *Staphylococcus* či *Neisseria sp.*), tak i bakteriální taxony spojené s parodontitis.

Parodontitis je zánětlivé onemocnění stejně jako některá onemocnění KVS. Pojítkem mezi oběma jsou bakterie, které dominují v etiologii bakteriální endokarditis a uvažuje se i o jejich vlivu na poškození endotelu srdečních chlopní a cévního endotelu v mechanismu aterogeneze. Jako etiologická agens poškození cévního endotelu byly identifikovány mnohé mikroorganismy, např. *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus, herpes viry, streptokoky, stafylokoky, *P. gingivalis* a další periopatogenní bakterie [Pallash et al., 2000, Shi a Tokunaga, 2002, Libby et al., 2002, Szulc et al., 2015]. Všechny tyto práce se ovšem zaměřují pouze na jediný vyšetřovaný patogen a nezohledňují ostatní přítomné mikroorganismy. Zdánlivě tak sice prokazují přímou souvislost daného patogenu s KVO, ale ve skutečnosti se na jejich vzniku může kromě identifikovaného agens podílet jakýkoliv či každý mikroorganismus, se kterým se člověk za svůj život setká. Proto považujeme za vhodnější charakterizovat kompletní mikrobiom ve tkáni srdeční chlopně, a za účelem stanovení vlivu parodontitis na rozvoj KVO považujeme za nutné tento dále korelovat s mikrobiomem dutiny ústní, jak je uvedeno v experimentální části I této práce.

Ve studiích týkajících se identifikace orálních bakterií, případně bakterií osidlujících tkáň parodontu, jsou většinou uváděny výsledky identifikace bakteriálních taxonů ve formě frekvence výskytu jednotlivých taxonů, nikoli ve formě relativní abundance u každého jednotlivce jako v naší studii, což činí problém při porovnání našich výsledků s některými dalšími studiemi. Dokonce ani průměrná relativní abundance konkrétního taxonu pro určitou skupinu sledovaných pacientů není vhodným markerem, neboť vždy záleží na charakteristikách celého mikrobiálního společenstva ve sledované tkáni konkrétního pacienta a na specifické interakci tohoto společenstva s imunitním systémem toho kterého pacienta.

Ve studii Nakana a kol. byla k taxonomické charakterizaci mikrobiomu ze vzorků srdečních chlopní, ateroskových plátů a ze vzorků z dutiny ústní (vzorky plaku odebírané Grayceho kyretami z mesiální a distální plochy zubu) použita metoda sekvenace 16S rRNA. Bohužel v této studii nejsou uvedena zjištěná data vyplývající z parodontologického vyšetření pro každého pacienta zařazeného do studie a výsledky bakteriální analýzy zobrazují frekvence, nikoli relativní abundance jako v případě naší studie, tudíž nemůžeme výsledky objektivně porovnat. Ovšem z výsledků studie je jednoznačné, že byla identifikována DNA bakteriálních taxonů spojených s onemocněním parodontu ve tkáních KVS (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Campylobacter rectus*, *A. actinomycetemcomitans* a *T. denticola*) [Nakano et al., 2006], což se též shoduje s výsledky naší studie. V další studii Fiehna a kol. z roku 2005 nebyly nalezeny ve vzorcích aterosklerotického plátu z a. carotis a a. femoralis živé bakterie, pouze bylo detekováno sporadické množství DNA *P. gingivalis* a *P. intermedia* [Fiehn et al., 2005], což odpovídá skutečnosti, že periopatogenní bakterie jsou fakultativně či striktně anaerobní, a proto velmi obtížně kultivovatelné či nekultivovatelné. V naší studii byla identifikována *P. intermedia* ve vzorku chlopně i ve vzorku z dutiny ústní u pacienta č. 9 a *P. gingivalis* ve vzorcích z chlopně i z dutiny ústní u pacientů č. 9, 11 a 12.

Jak již bylo uvedeno výše, ve tkáni srdeční chlopně byly detekovány taxony spojené nejen s parodontitis, ale i se zdravým parodontem. Streptokoky a stafylokoky nepatří mezi periopatogenní bakterie, ale jsou spojovány s kariézními lézemi. Mezi nejvýznamnější kariogenní bakterie patří *S. mutans* a *mitis*. Na druhou stranu jsou rody *Streptococcus* a *Staphylococcus* nejčastějšími příčinami bakteriální infekční endokarditis. V naší studii byly bakteriální taxony náležející do rodu *Streptococcus* identifikovány u všech čtyř pacientů ve druhé fázi sekvenování ve vzorcích z dutiny ústní i ze srdeční chlopně. Ovšem nelze jednoznačně říci vzhledem k počtu vyšetřených pacientů, že byla nalezena přímá souvislost mezi aktuálním mikrobiomem dutiny ústní a tkáně srdeční chlopně ve stejném čase. Pokud porovnáme zvláště u každého pacienta relativní abundance mezi vzorkem z dutiny ústní a ze srdeční chlopně, pak u pacienta č. 9 převažují *S. mitis* a *anginosus* ve tkáni srdeční chlopně, u pacienta č. 10 převažuje *Streptococcus parasanguinis* ze vzorku z dutiny ústní nad *Streptococcus mitis* a *sanguinis* ze vzorku srdeční chlopně, u pacienta č. 11 jednoznačně převažují *S. sanguinis* a *salivarius* ze vzorků z dutiny

ústní a u pacienta č. 12 převažuje *S. parasanguinis* ve vzorku ze srdeční chlopně. Výsledky tedy přinejmenším ukazují, že orální streptokoky osídlují i tkáň srdeční chlopně. Naše výsledky se tedy shodují s dalšími studiemi Fiehna a kol., která identifikovala *S. mutans*, *mitis* a *oralis* ze vzorků plaku a krve u dvou pacientů, u nichž byla potvrzena streptokoková endokarditis. Navíc byly tyto bakteriální taxony porovány konvenčními mikrobiologickými metodami a ribotypizací. Prezentované výsledky ukázaly identické bakteriální taxony *S. mutans*, *mitis* a *oralis* ve vzorcích plaku a krve u obou pacientů se streptokokovou endokarditis [Fiehn et al., 1995]. Další typické orální taxony spojované s KVO jsou *S. aureus* a koaguláza negativní *Staphylococcus* – jsou běžnou součástí orální mikroflóry a způsobují až 30 % infekčních endokarditid. Studie Nataloniho popisuje identifikaci *S. aureus* i koaguláza negativního *Staphylococcus* v protetické náhradě srdeční chlopně u pacientů s endokarditis [Nataloni et al., 2010]. V naší studii jsme tyto bakteriální taxony identifikovali v první fázi sekvenování u pacienta č. 7 a ve druhé fázi sekvenování u pacienta č. 9 ve vzorcích ze srdeční chlopně.

Mezi další bakteriální taxony, které nepatří mezi typické periopatogenní bakterie a byly identifikovány v naší studii ve vzorcích srdeční chlopně, patří *N. mucosa*, *H. parainfluenzae* a *P. acnes*. *N. mucosa* byla v naší studii identifikována u pacienta č. 12 s relativní abundancí 9,6 % ve vzorku z tkáně srdeční chlopně a u pacientů č. 10 a 11 s velmi nízkou hodnotou relativní abundance (0,1 – 0,2 %) též ve vzorku z tkáně srdeční chlopně. Naopak ve vzorcích z dutiny ústní u pacientů č. 10 a 11 byly zjištěny hodnoty relativní abundance 33,7 % a 15,9 %. V souvislosti s osídlením sliznice dutiny ústní tímto bakteriálním taxonem popisuje studie Tronela endokarditis, u které byla verifikována jako příčina *N. mucosa*, u dvacetileté ženy ve spojitosti se zánětem jazyka po vyjmutí piercingu [Tronel et al., 2001]. *N. mucosa* je též uváděna jako příčina endokarditis srdeční chlopně ve studii Hollenbecka [Hollenbeck et al., 2015] a vzácné, ale těžké endokarditis aortální chlopně ve studii Pilmise, kde je mj. v klinickém vyšetření pacienta popisován dentální absces [Pilmis et al., 2014]. Výsledky těchto studií naznačují, že *N. mucosa* je sice komenzálem dutiny ústní, ale její patogenní potenciál ke tkáním KVS je nesporný.

H. parainfluenzae je typickým taxonem orálního mikrobiomu [Kilian a Schiott, 1975] a řadí se s dalšími gramnegativními taxony, mezi které patří i bakterie typicky osídlující tkáň parodontu (*A. actinomycetemcomitans* a *E. corrodens*), do skupiny

označované HACEK. Incidence bakteriální endokarditis způsobené skupinou HACEK činí ze všech endokarditid <5 %. V naší studii byl *H. parainfluenzae* identifikován u všech čtyř pacientů vyšetřovaných ve druhé fázi sekvenování ve vzorcích chlopní i z dutiny ústní. S nejvyšší relativní abundancí 17,4 % byl identifikován ve tkáni srdeční chlopně u pacienta č. 10 a ve vzorku z parodontálního chobotu u pacienta č. 12 s relativní abundancí 30,7 %. Společně s *A. actinomycetemcomitans* byl identifikován u pacientů č. 9, 10 a 12. U pacienta č. 10 byly identifikovány tři z pěti bakteriálních taxonů patřících do skupiny HACEK: *H. parainfluenzae*, *Aggregatibacter segnis* a *E. corodens*. Zbývající zástupci skupiny HACEK, tedy *Cardiobacterium sp.* a *Kingella sp.*, identifikovány u toho pacienta nebyly. Pouze u pacienta č. 12 byl bakteriální taxon *C. hominis* identifikován s relativní abundancí 0,2 % ve tkáni srdeční chlopně. *Kingella sp.* nebyla identifikována ani u jednoho ze čtyř pacientů zařazených do druhé fáze sekvenování.

P. acnes je aerotolerantní anaerobní grampozitivní bakterie, která je spjata s výskytem akné. Byla též zjištěna jako původce poškození srdečních chlopní [Banzon et al., 2017, van Valen et al., 2016]. V naší studii byla identifikována majoritně ve všech čtyřech vzorcích srdeční chlopně zařazených do druhé fáze sekvenování na rozdíl od vzorků z dutiny ústní, kde byla též identifikována, ovšem s relativními abundancemi blízcími se 1 %.

Mnohé publikované práce hodnotily souvislost mezi parodontitis chronica a zvýšeným rizikem KVO stanovením přítomnosti či nepřítomnosti bakteriální DNA periopatogenních bakterií (např. *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* a *P. intermedia*) ve tkáních KVS [Haraszthy et al., 2000, Taylor-Robinson et al., 2002, Ford et al., 2005, Cortelli et al., 2005, Fiehn et al., 2005, Kurihara et al., 2004]. Přítomnost periopatogenních bakterií ve tkáních srdečních chlopní byla shodně s naší studií opakovaně prokázána [Nakano et al., 2006, Nakano et al., 2009, Oliveira et al., 2015]. Ve studii Chalupové a kol. [Chalupova et al., 2018] bylo vyšetřováno 41 srdečních chlopní u pacientů před náhradou srdeční chlopně. Pacienti byly též stomatologicky vyšetřeni, jak uvádí studie, privátním stomatologem a byl zhotoven OPG snímek, což by mohlo hrát roli v případě korelace výsledků identifikace bakteriálních taxonů ve vzorcích chlopně s klinickým stavem chrupu či samotného parodontu. Ve studii není bohužel stav klinického vyšetření zaznamenán. Ve studii se uvádí, že nejméně tři týdny před kardiochirurgickým výkonem pacienti

neužívali antibiotika. Ovšem není uvedeno, zda antibiotika byla aplikována jako *lege artis* postup před kardiochirurgickým výkonem a v průběhu postoperačního léčení pacienta. Toto považujeme za zásadní informaci, protože nepodání antibiotik před kardiochirurgickým výkonem by byl *non lege artis* postup, ale na druhou stranu bakteriální spektrum by po PCR nebylo ovlivněno podáním antibiotik. V této studii nebyly identifikovány žádné bakteriální taxony při použití standardních kultivačních medií (agary) ve vzorcích srdečních chlopní. U 21 pacientů byla identifikována samotná bakteriální DNA ve vzorcích srdeční chlopně, z těchto 21 vzorků u 20 vzorků byla identifikována bakteriální DNA grampozitivních bakterií a pouze v jednom vzorku chlopně DNA gramnegativních bakterií. Bakteriálním taxonem s nejvyšší frekvencí byla *P. acnes*, která byla i v naší studii shodně identifikována u všech čtyř pacientů zařazených do druhé fáze sekvenování. Dalšími shodně s naší studií identifikovanými bakteriálními taxony byly *Streptococcus sanguinis*, *oralis* a *Streptococcus sp.*, které byly identifikovány u všech čtyř pacientů. Dalšími grampozitivními bakteriemi, které byly identifikovány ve studii Chalupové, byly *Carnobacterium sp.* a *Bacillus sp.*, které v naší studii identifikovány nebyly ani u jednoho pacienta. Z gramnegativních bakteriálních taxonů byla identifikována pouze *Bergeyella sp.* v jednom vzorku srdeční chlopně. V naší studii byl tento bakteriální taxon identifikován u pacienta č. 10 s relativní abundancí 0,4 % a u pacienta č. 12 *Bergeyella HOT 322* s relativní abundancí 0,3 % a *Bergeyella HOT 319* s relativní abundancí 0,1 %.

Jiné studie popisují zjištění orálních bakterií i v aortálním aneurysmatu, cévní stěně nebo ateromovém plátu [Van Dyke a Winkelhoff, 2013, Beck et al., 2005, Kozarov, 2012, Dahlén et al., 2012]. V některých studiích ale tato souvislost prokázána nebyla (viz dále).

Dalšími bakteriálními taxony, které byly v naší studii identifikovány ve tkáni srdeční chlopně, jsou ty, jež jsou spojovány se zánětlivým onemocněním parodontu: *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *Veillonella dispar*, *Alloprevotella tanneriae* aj.

V naší studii byl bakteriální taxon *F. nucleatum* identifikován u všech čtyř pacientů ve druhé fázi sekvenování a zajímavé je, že u všech čtyř pacientů je jedním z majoritních taxonů v obou lokalitách a s ohledem na jeho vlastnosti (schopnost tvořit biofilm, usnadňovat kolonizaci dalším periopatogenním bakteriím, např.

P. gingivalis), je jeho výskyt ve tkáni srdeční chlopně rozhodně varujícím jevem. Významnou vlastností *F. nucleatum* je, že zvyšuje invazi *P. gingivalis* do lidských gingiválních buněk a endoteliálních buněk aorty [Saito et al., 2008]. Tato informace dokazuje vzájemnou kooperaci těchto bakteriálních taxonů a potvrzuje nutnost posuzovat jednotlivé bakteriální vztahy komplexněji. Jestliže budeme posuzovat přítomnost *P. gingivalis* a *F. nucleatum* u našich pacientů, pak u pacientů č. 9 a 11 byla relativní abundance u těchto dvou taxonů nejvyšší ze všech taxonů identifikovaných ve tkáni srdeční chlopně. U pacienta č. 12 nebyla relativní abundance sice nejvyšší, ale tyto bakteriální taxony přesto byly identifikovány ve tkáni srdeční chlopně. Naše výsledky by tudíž mohly podpořit tvrzení ze studie Saita a kol. o kooperaci těchto dvou bakteriálních taxonů [Saito et al., 2008].

Další bakteriální taxony (*Selenomonas sp.*, *Aggregatibacter sp.*, *Prevotella sp.*, *Treponema socranskii*) asociované s tkáněmi parodontu byly v naší studii zastoupeny s nižší relativní abundancí ve tkáni srdeční chlopně než ve vzorku z parodontálního chobotu. *Selenomonas sp.* patří do čeledi *Veillonellaceae* a je bakterií detekovanou jak u pacientů s generalizovanou agresivní formou parodontitis, tak pacientů s chronickou formou parodontitis [Drescher et al., 2010, Gonçalves et al., 2012]. V naší studii byl tento bakteriální taxon identifikován s relativní abundancí 1,5 % ve tkáni srdeční chlopně u pacienta č. 11. Shodně detekovali *Selenomonas sp.* ve stenotické aortální chlopni ve studii Kolltveit a kol. [Kolltveit et al., 2009]. Pacienti v této studii nebyli parodontologicky vyšetřeni. Mohli bychom se domnívat, vzhledem k věku pacientů zařazených do studie ($72,7 \pm 15$ let), že alespoň u některých z nich mohla být diagnostikována parodontitis.

Alloprevotella tanneriae byla shodně v naší studii u pacienta č. 9 i ve studii Filho a kol. identifikována ve vzorku srdeční chlopně i ve vzorku z dutiny ústní [Filho et al., 2014]. V metodice této studie je uvedeno, že vzorky z parodontálních chobotů byly odebírány z lokalit hlubších než 5 mm, což lze považovat za dostačující informaci o stavu parodontu pacientů zařazených do studie, a pacienti tudíž měli středně pokročilou nebo pokročilou parodontitis dle klasifikace AAP.

T. denticola byla též shodně s naší studií identifikována ve vzorcích aortální chlopně, a navíc i ve tkáni komorového myokardu společně s dalšími deseti bakteriálními taxony osidlujícími tkáň parodontu [Ziebolz et al., 2018]. Tato studie je jednou z posledních studií zabývajících se detekcí parodontálních bakterií v srdeční

tkáni. Byly v ní použity molekulární metody k detekci bakteriální DNA navíc s imunohistochemickou přípravou vzorků pro detekci LBP a pro hodnocení zánětlivých markerů makrofágů CD68, receptoru LPS vázajícího protetinu (CD14) a LBP (big42). Parodontologické vyšetření pacientů potvrdilo parodontitis chronica u 28 ze 30 pacientů zařazených do této studie a DNA identických periopatogenních bakterií byla identifikována v atriálním a komorovém myokardu i v parodontálních chobotech u všech 28 pacientů [Ziebolz a kol. 2018].

Dalším bakteriálním taxonem spojovaným s endokarditis nativních chlopní i jejich protetických náhrad je *Veillonella* dispar [Saladi et al., 2017]. V naší studii byla identifikována u všech čtyř pacientů ve druhé fázi sekvenování ze tkáně srdeční chlopně. Ve vzorcích z parodontálního chobotu byla u pacientů č. 11 a 12 identifikována s vyšší relativní abundancí 17,7 % a 10 % ve srovnání se vzorky pocházejícími ze srdeční chlopně, kde byla identifikována s velmi nízkými relativními abundancemi.

Je ovšem nutné uvést, že existují i studie, kterým se přítomnost bakterií ve tkáních srdeční chlopně prokázat nepodařilo. Mezi tyto studie, které nedetekovaly bakteriální DNA ve tkáni srdeční chlopně patří např. studie Raffaelliho [Raffaelli et al., 2010], kde bylo vyšetřeno celkem 19 srdečních chlopní pacientů, kteří podstoupili kardiochirurgický výkon pro stenózu aortální chlopně na Catholic University of the Sacred Heart Roma a byli shodně s naší studií podrobně parodontologicky vyšetřeni. Rozdíl v metodice Raffaelliho studie oproti naší studii je ve vyšetření přítomnosti DNA parodontálních bakterií v periferní krvi pacientů. V naší studii jsme periferní krev pacientů nevyšetřovali. Dále na rozdíl od naší práce, kde použitá metoda sekvenování umožnila identifikaci celého spektra přítomných mikroorganismů, Raffaelli testoval metodou PCR pouze přítomnost či nepřítomnost cíleně vybraných druhů periopatogenních bakterií, a ty ve svých vzorcích nedetekoval. V Raffaelliho studii byla použita technologie PCR reakce zaměřená pouze na následující bakteriální taxony: *Tannerella forshytia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *E. corrodens* a *T. denticola*. Výsledky této studie ukazují, že v 19 vyšetřených aortálních chlopních ani ve vzorcích periferní krve nebyla detekována DNA parodontálních bakterií [Raffaelli et al., 2010]. Shodně s Raffaelliho studií ani ve studii Radwana-Oczka [Radwan–Oczko et al., 2014] nebyla detekována DNA *P. gingivalis* ve vzorcích srdeční chlopně. Autor

studie Radwan-Oczko se zaměřil na detekci samotné *P. gingivalis* pomocí 16S rRNA PCR. Pokud bychom chtěli obě studie porovnat, pak lze pouze konstatovat, že stanovení jednotlivých taxonů, ať už jednoho vybraného anebo nějakého určitého souboru, není dostatečně reprezentativní. Z vyhodnocení kompletního složení mikrobiomu u našich čtyř vzorků ve druhé fázi sekvenování, což považujeme za velmi malý soubor, je zřejmé, že bakterie se na srdeční chlopni vyskytovat mohou, ale taxonomické spektrum bude ovlivněno pravděpodobně řadou faktorů, tj. jak dostupností taxonů v daném hostiteli (např. jejich vysoká abundance v dutině ústní a příležitost ke vstupu do krevního oběhu díky parodontitis), tak i citlivostí hostitele vůči konkrétním taxonům (nastavení imunitního systému, celkový zdravotní stav apod.). Prokázání přítomnosti či nepřítomnosti jednoho nebo několika vybraných taxonů tedy nemá potenciál celý systém komplexně charakterizovat, a tudíž je obtížné z takových výsledků činit nějaké závěry.

Velmi důležité je zde uvést, že pacientům jsou před kardiochirurgickými výkony podávána širokospektrá antibiotika v rámci snížení rizik spojených s bakteriální infekcí, stejně tomu tak bylo i u pacientů zařazených do naší studie. Lze se tedy domnívat, že předoperační suplementace antibiotiky, jako *lege artis* postup, mohla ovlivnit výsledky naší i řady jiných studií.

Pokud bychom srovnávali taxonomické bakteriální složení na chlopňovém materiálu s klinickým stavem parodontu u pacientů dle výsledků naší studie, můžeme říci, že dle klinického vyšetření všichni čtyři pacienti z druhé fáze testování, které považujeme za relevantnější, mají pokročilou parodontitis chronica s resorpcí alveolární kosti dosahující u pacientů č. 9 a 10 do oblasti mezikořenového prostoru. Index BOP je u všech čtyř pacientů vyšší, než odpovídá fyziologickému stavu. PD se pohybovala v rozmezí 7-10 mm. *P. gingivalis* a *F. nucleatum* dominovaly ze všech identifikovaných bakteriálních taxonů u pacienta č. 9 ve vzorku srdeční chlopně, což se shoduje s klinickým parodontologickým vyšetřením. U pacienta č. 10 převažovaly neperiopatogenní bakterie *H. parainfluenzae* a *P. acnes*, i když stav parodontu odpovídal pokročilé chronické parodontitis. U pacientů č. 11 a 12 s pokročilou parodontitis chronica převažují v chlopňovém materiálu periopatogenní bakterie *F. nucleatum*, *TM7 [G-5]* a *P. gingivalis*. Vzhledem k předčasnému ukončení studie a vyšetření malého množství pacientů ve druhé fázi testování nelze jednoznačně

určit míru asociace mezi stavem parodontu a bakteriálními taxony osidlujícími tkáň srdeční chlopně.

Ovšem na druhou stranu je možné říci, že ve druhé fázi testování byly identifikovány periopatogenní bakterie ve tkáni srdeční chlopně. U pacienta č. 9 byly identifikovány ve vzorku chlopně s nejvyšší relativní abundancí *P. gingivalis*, *F. nucleatum* a neperiopatogenní *H. parainfluenzae* a *S. mitis*, což neodpovídá bakteriálnímu spektru identifikovaných taxonů ze vzorků dutiny ústní, kde převažovaly bakteriální taxony osidlující tkáň parodontu, ať již periopatogenní či nepatogenní. U pacienta č. 10 ve vzorku ze srdeční chlopně dominovaly neperiopatogenní bakterie *P. acnes* a *H. parainfluenzae*. Druhý uvedený bakteriální taxon byl identifikován shodně i ve vzorku z dutiny ústní společně s dalším komenzálem dutiny ústní *N. mucosa*, která naopak ve vzorku srdeční chlopně byla identifikována s velmi nízkou relativní abundancí. U pacienta č. 11 převažovaly ve tkáni srdeční chlopně periopatogenní bakteriální taxony *F. nucleatum*, *P. gingivalis* a *TM7*. Naopak ve vzorku z dutiny ústní převažovaly jiné bakteriální taxony (*V. dispar*, *N. mucosa*, *S. salivarius* aj.), které ve vzorku srdeční chlopně byly identifikovány s nízkou relativní abundancí. U pacienta č. 12 převažovaly ve vzorku srdeční chlopně tyto bakteriální taxony: *F. nucleatum*, *N. mucosa* a *P. acnes*. Naopak ve vzorku z dutiny ústní převládl bakteriální taxon *H. parainfluenzae* a bakteriální taxony s nejvyšší relativní abundancí ve vzorku chlopně byly naopak zastoupeny s velmi nízkou relativní abundancí. Z těchto výsledků vyplývá, že i když jsme identifikovali shodné bakteriální taxony ve dvou zcela odlišných lokalitách lidského organismu, jejich relativní abundance jsou v těchto dvou orgánových strukturách odlišné. Každý z bakteriálních taxonů má rozdílné vlastnosti a schopnosti odolávat imunitním mechanismům lidského organismu, a přestože se část bakterií z dutiny ústní dostane do tkání jiných orgánů, neznamená to, že mohou vytvořit identická společenství, kde fungují stejné mechanismy jako v dutině ústní. Struktura srdeční chlopně je umístěna v turbulentním krevním proudu, proto je též uvažováno o vlivu tohoto proudění na možnost adheze bakterií ke tkáním srdeční chlopně ve srovnání s cévní stěnou či aterosklerotickým plátem, jak popisuje Nakano ve své studii [Nakano et al., 2006]. Shodně je ve studii Ziebolze a kol. uvažováno o vlivu tlaku krve na množství detekované bakteriální DNA [Ziebolz et al., 2018]. Ovšem na druhou stranu rody *Streptococcus* či *Staphylococcus*, které patří mezi nejčastější příčiny

bakteriální endokarditis musí být schopny tomuto turbulentnímu proudění krve dostatečně odolávat pravděpodobně díky svým adhezivním mechanismům. Předmětem dalšího výzkumu bude, jakými mechanismy adherují orální bakterie ke stěně srdeční chlopně či jiné tkáni kardiovaskulárního systému, jak společně kooperují či nekooperují na jedné straně kariogenní bakterie a na straně druhé periopatogenní bakterie a jaké virulentní faktory v těchto dějích využívají [Freires et al., 2016, Olsen a Progulske-Fox, 2015].

V naší druhé experimentální části jsme hodnotili a porovnávali hodnoty CRP z periferní krve u pacientů s parodontopatiemi. Naše výsledky hodnot CRP u pacientů s agresivní parodontitis se pohybovaly kolem $2,82 \pm 2,1$ mg/L. Goyal a kol. publikovala nejvyšší hodnoty CRP u pacientů s agresivní parodontitis a nejnižší hodnoty u zdravých kontrol [Goyal et al., 2014]. Jiné studie ukázaly zvýšené hodnoty CRP u pacientů s chronickou parodontitis ve srovnání s pacienty s gingivitis [Jayaprakash et al., 2014, Shojaee et al., 2013]. Můžeme tedy říci, že hodnoty CRP vzrůstají s postižením tkání parodontu. Pokud porovnáme naše výsledky např. s indickou studií, kde byly naměřeny hodnoty CRP $6,1 \pm 3,2$ mg/L [Bolla et al., 2017], lze zde uvažovat o etnických rozdílech, které se mohou projevit nejen rozdílnou mírou destrukce parodontu, ale je třeba zohlednit možné imunologické rozdíly mezi etniky. Naopak ve druhé indické studii byly výsledky hodnot CRP téměř identické s naší studií [Chandy et al., 2017]. Je zajímavé, že v této studii byly hodnoty CRP vyšší u pacientů s chronickou parodontitis ($3,4 \pm 2,5$ mg/L) oproti pacientům s agresivní parodontitis ($2,7 \pm 2,6$ mg/L). V tomto případě je pravděpodobně nutné korelovat výsledky CRP a klinického vyšetření parodontu, kdy hodnoty indexu krvácení (BOP) byly vyšší (85 %) u pacientů s chronickou parodontitis, stejně jako průměrná hloubka sondáže 5,7 mm, oproti nižší hodnotě indexu BOP u pacientů s agresivní parodontitis (69 %) a průměrnou hloubkou sondáže 5,5 mm. V naší studii byl výsledek hodnot CRP zcela opačný, stejně jako výsledky hloubky sondáže a krvácení po sondáži, které byly naměřeny vyšší u pacientů s agresivní parodontitis. Na tomto místě je důležité připomenout, že vyšetření BOP a hloubky sondáže je ovlivněno jistou chybou během vyšetření, které provádí manuálně vyšetřující lékař.

Zvýšené hodnoty CRP a IL-6 byly též naměřeny u pacientů s neléčenou agresivní parodontitis ve srovnání s kontrolní skupinou [Wohlfeil et al., 2012]. Mohli bychom také korelovat naše výsledky hodnot CRP a hodnot CRP naměřených ze

sliny nebo sulkulární tekutiny. Jayaprakash a kol. ve své studii popsal vyšší hodnoty CRP v sulkulární tekutině ($0,00249 \pm 0,00047$ mg/L) pacientů s parodontitis ve srovnání s pacienty s gingivitis ($0,00140 \pm 0,00032$ mg/L) a pacienty se zdravým parodontem ($0,00056 \pm 0,0002$ mg/L), což v porovnání s našimi výsledky jsou hodnoty CRP 1000x nižší [Jayaprakash et al., 2014]. Studie prováděná Shojaee a kol. demonstrovala rozdíly mezi hodnotami CRP u zdravých pacientů ($0,00310851 \pm 0,00357447$ mg/L) a pacientů s gingivitis ($0,00354541 \pm 0,00306138$ mg/L) a chronickou parodontitis ($0,00533262 \pm 0,00505163$ mg/L). V této studii byla hodnota CRP měřena ze vzorků nestimulované sliny a v porovnání s našimi výsledky též byly hodnoty CRP 1000x nižší. Statistická analýza ukázala signifikantní rozdíl v koncentraci CRP u pacientů s parodontitis a u zdravých kontrol ($p = 0,045$) [Shojaee et al., 2013]. Podle této studie by bylo možné použít CRP v predikci či časné detekci onemocnění parodontu [Shojaee et al., 2013]. Pacienti s gingivitis a zdravou gingivou měli nižší hodnoty CRP než pacienti s chronickou parodontitis. Mimoto se vzrůstající závažností zánětu se úměrně zvyšuje hladina CRP [Bansal et al., 2014].

Dle našich výsledků se vzhledem k velmi malým rozdílům mezi hodnotami CRP u pacientů s parodontopatiemi domníváme, že nelze jednoznačně říci, že jistá hodnota CRP odpovídá agresivní či chronické parodontitis. CRP je především nespecifický marker akutního zánětu, jehož produkce hepatocyty závisí především na cytokinech IL-6 a IL-1, jejichž koncentrace vzrůstá nejen při parodontitis, ale při jakékoliv bakteriální infekci.

Ve třetí experimentální části jsme hodnotili změny CRP v průběhu parodontologické léčby u pacientů s agresivní formou parodontitis, tzn. s těžším a rychleji progredujícím postižením parodontu u povětšinou mladších pacientů bez systémových onemocnění. V této skupině nebyl ani jeden testovaný pacient, u kterého by se klinicky projevilo jakékoli onemocnění KVS. Tuto skupinu pacientů jsme se rozhodli sledovat dlouhodobě, nejen co se týče stavu parodontu, nýbrž i dalších rizikových faktorů KVS.

Změny hodnot CRP by mohly být podmíněny různými faktory, mezi které patří vysoký krevní tlak, konzumace alkoholu, kouření, chronická únava, těhotenství nebo laktace, diabetes mellitus, poruchy spánku, deprese a mnoho jiných systémových onemocnění [Graziani et al., 2010].

Etnická příslušnost byla zjišťována v souvislosti s ovlivněním hodnot CRP [Sun et al., 2009] a data z rozmanitých populací nejsou srovnatelná. V naší studii byli testováni pouze pacienti kavkazské rasy. Studie z USA zaznamenaly průměrné hodnoty CRP 2,05 mg/L u pacientů s generalizovanou agresivní parodontitis a CRP 1,1 mg/L u pacientů s lokalizovanou formou [Salzberg et al., 2006], což by se v zásadě shodovalo s výsledky naší studie. Jiné studie z USA ukázaly průměrné hodnoty CRP 4,06 mg/L u pacientů s vysokými průměrnými hodnotami CAL ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých probandů. Z této studie tedy vyplývá pozitivní korelace mezi klinickým stavem parodontu a hodnotou CRP [Noack et al., 2001]. Holandská studie popisuje nejvyšší hodnoty CRP (1,45 mg/L) u pacientů s generalizovanou formou parodontitis a CRP 1,30 mg/L u pacientů s lokalizovanou formou [Loos et al., 2000]. Jiné studie z Indie ukázaly hodnoty CRP 7,49 mg/L u pacientů s agresivní formou parodontitis a CRP 4,88 mg/L u pacientů s chronickou parodontitis [Chopra et al., 2012], což by mohlo ukazovat na možnou korelaci etnického původu pacientů s hodnotou CRP.

Studie Giannopoulou také hodnotila změny CRP v průběhu parodontologické léčby. Na rozdíl od naší studie, kdy nebyla zařazena do hodnocení chirurgická fáze parodontologické léčby, v této studii byly jednotlivé hodnoty CRP stanoveny tři měsíce po konzervativní terapii a šest a dvanáct měsíců po chirurgické fázi parodontologické léčby, která plynule navazovala na konzervativní ošetření parodontu. Pacienti byli též rozděleni do dvou skupin, kdy jedné z nich byl ordinován amoxicillin s kyselinou klavulanou během konzervativní terapie a druhé skupině byla antibiotika ordinována během druhé chirurgické fáze. Zajímavým výsledkem této studie je, že nechirurgické ošetření snížilo peak biologických markerů bez ohledu na použitá antibiotika a další chirurgická terapie ani již dříve zmíněná antibiotika nezvýšila tento efekt [Giannopoulou et al., 2016]. Další studie, která hodnotila a porovnávala změny CRP u pacientů s agresivní formou parodontitis a chronickou formou parodontitis byla studie Ramich a kol. Jednotlivá měření CRP a počtu leukocytů byla uskutečněna před zahájením terapie, dále po 12 a 60 měsících. Pacienti obou skupin byli ošetřeni konzervativně (deep scaling a root planing) a u některých proběhla i chirurgická terapie. Všem pacientům byla ordinována širokospektrá antibiotika a také lokální antimikrobiální terapie ve formě výplachů dutiny ústní roztokem chlorhexidini digluconati 0,12 % a lokální aplikace gelu

Chlorhexamed 1 % na dorsum linguae. Z výsledků studie vyplývá, že k poklesu CRP došlo pouze u skupiny pacientů s agresivní formou parodontitis a naopak počet leukocytů byl v této skupině pacientů po 60 měsících vyšší než u pacientů s chronickou formou parodontitis. K redukci hodnot klinických parametrů (BOP a PD) došlo v obou skupinách pacientů mezi 12. a 60. měsícem terapie [Ramich et al., 2018].

Zásadní otázkou je korelace výsledků klinického vyšetření parodontu, identifikace orálních či parodontálních bakterií či jejich produktů a určení rizika KVO. Ze studie Becka a kol., kde byla hodnocena souvislost mezi KVO a IgG protilátkami 17 parodontálních mikroorganismů společně s klinickými parodontologickými parametry u kuřáků i nekuřáků vyplynulo, že klinické parodontologické parametry nejsou asociované s KVO, na druhou stranu některé bakteriální taxony by mohly více korelovat s KVO [Beck et al., 2005].

Novinky získaných výsledků byly založeny na srovnání čtyř typů parodontálních onemocnění, obvykle byly srovnávány dva až tři typy a srovnávání rozmanitých parodontologických indexů s následně zaznamenanými hodnotami CRP z periferní krve pacientů.

Statistické korelace mezi naměřenými BOP a PD a zjištěnými hodnotami CRP byly stanoveny u pacientů s parodontitis (skupina A a B). Index BOP ukázal největší pozitivní korelaci s hodnotou CRP u pacientů s agresivní parodontitis ve srovnání se skupinou pacientů s chronickou parodontitis, což se shoduje se studií Bokhari a kol. [Bokhari et al., 2014]. V obou těchto skupinách ukázal BOP index větší míru pozitivní korelace s hladinou CRP ve srovnání s PD. Signifikantně nižší hodnoty CRP byly zjištěny u pacientů s gingiválními recesy, pokud jsme je srovnávali s pacienty s agresivní a chronickou parodontitis. Gingivální recesy jsou nezánětlivým onemocněním parodontu, proto je elevace CRP nízká.

Velice důležitou otázkou v této problematice je srovnání indexu BOP a hodnot CRP. BOP je jedním z nejdůležitějších parametrů pro hodnocení stavu parodontu u pacientů s parodontitis a je též jediným parodontálním parametrem, který ukazuje signifikantní vztah se systémovými markery, mezi které patří CRP, hladina fibrinogenu, počet bílých krvinek, což bylo potvrzeno studií Bokhari a kol. [Bokhari et al., 2014]. Zjištěné vztahy mezi stavem parodontu a systémovým CRP ukázaly, že zánět parodontu (pozitivní BOP) by mohl být jedním z faktorů přispívajících

k systémovému zánětu. Otázkou pro další výzkumné práce zůstává, zda by bylo možné hodnotit stav parodontu prostřednictvím systémových markerů ještě před klinickými projevy onemocnění nebo monitorovat stav parodontu v průběhu terapie bez klinických projevů onemocnění a mít tak možnost predikovat případný relaps onemocnění.

19. Závěr

Studium mikrobiomu asociovaného s tkáněmi lidského těla patří v současné době k základním pilířům výzkumu nejen v parodontologii, ale ve všech oborech humánní medicíny. Parodontitis je sice onemocnění postihující závěsný aparát zubu, a tudíž týkající se dutiny ústní, ovšem její souvislost s řadou systémových onemocnění je dnes zjevná. O aktuálnosti tohoto tématu svědčí i množství studií zabývajících se problematikou samotné parodontitis jako rizikového faktoru systémových onemocnění. Z tohoto důvodu jsou intenzivně studovány bakterie osidlující tkáň parodontu, mechanismy jejich účinku, ovlivnění systémové či lokální imunitní odpovědi organismu a konečně i jejich případný dlouhodobý účinek na řadu systémových onemocnění.

Je možno říci, že léčba parodontitis je vnímána jako součást komplexní terapie některých systémových onemocnění. V budoucnu by měla být spolupráce odborného lékaře (kardiologa, nefrologa, internisty) a parodontologa samozřejmostí.

DNA parodontálních bakterií byla prokazatelně detekována ze vzorků tkáně srdeční chlopně i z ateromových plátů.

Ve své disertační práci jsem sice potvrdil přítomnost DNA parodontálních bakterií ve všech vzorcích srdečních chlopní, ale otázkou zůstává jejich role v zánětlivých procesech tkání KVS, jejich vzájemná kooperace a mechanismy, kterými případně ovlivňují a mění fyziologické děje na patologické. Z čistě klinického hlediska je velmi důležité vnímat stav parodontu, potažmo orálního zdraví jako součást celkového zdravotního stavu, a léčba parodontitis by se měla stát nedílnou součástí léčebných postupů také u pacientů s KVO.

Systémové markery zánětu jsou dalším významným faktorem, který spojuje KVS a parodontitis. Ve své disertační práci jsem se sice zaměřil pouze na CRP u pacientů s různými onemocněními parodontu, ovšem na druhou stranu jsem prokázal signifikantní korelaci mezi parodontitis, přesněji klinickým stavem parodontu vyjádřeným pozitivním krvácením po sondáži parodontálních chobotů (BOP) a hodnotou CRP. Hodnoty CRP byly sice u pacientů s chronickou i agresivní formou elevovány, ale díky nespecifitě CRP pro tkáň parodontu nelze uvažovat o absolutní kauzalitě parodontitis v procesu elevace hladiny CRP. V budoucnu bude jistě potřeba najít jiný ke tkáním parodontu více specifický marker odrážející změny ve tkáních samotného parodontu.

Rizikové faktory onemocnění KVS a rizikové faktory parodontitis v kombinaci s výsledky naší studie by mohly vést ke komplexnějšímu pohledu, případně k hlubší odborné diskuzi týkající se parodontitis jako možného rizikového faktoru KVO. S problematikou oportunní metastatické infekce dentálního původu se stomatologové i lékaři dalších medicínských suboborů, setkávají denně ve svých klinických praxích, proto se snažíme implementovat výsledky naší studie do praxe a tím pomoci při řešení některých nejasností, které se týkají např. indikace extrakční terapie z parodontologických důvodů u pacientů před plánovanými kardiochirurgickými výkony.

Do budoucna bude velkou výzkumnou výzvou pokračování ve studiu korelace mezi KVS a parodontitis se zaměřením na studium mechanismů, kterými orální bakterie modifikují fyziologické funkce ve tkáních KVS a též hledání specifického systémového markeru, který by umožnil monitoring tkání parodontu a potažmo i KVS současně.

20. Literatura

Aimetti, M., Romano, F., Nesi, F.: Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *Journal of periodontology* 2007, 78(9), 1718-23.

Akshata, KR., Ranganath, V., Nichani, AS.: Thesis, antithesis, and synthesis in periodontal and systemic interlink. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2012,16(2), 168-73.

Al-Rasheed, A.: Elevation of white blood cells and platelet counts in patients having chronic periodontitis. *The Saudi dental journal* 2012, 24(1), 17-21.

Alard, JE., Dueymes, M., Youinou, P., Jamin, C.: Modulation of endothelial cell damages by anti-Hsp60 autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2007, 6(7), 438–443.

Amano, A., Chen, C., Honma, K., Li, C., Settem, RP., Sharma, A.: Genetic characteristics and pathogenic mechanisms of periodontal pathogens. *Advances in dental research* 2014, 26(1), 15-22.

Aoyama, N., Suzuki, JI., Kumagai, H., Ikeda, Y., Akazawa, H., Komuro, I., Minabe, M., Izumi, Y., Isobe, M.: Specific periodontopathic bacterial infection affects hypertension in male cardiovascular disease patients. *Heart Vessels* 2018, 33(2), 198-204.

Armitage, GC.: Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1995, 7, 39–53.

Armitage, GC.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 1999, 4(1), 1–6.

Armitage, GC.: Periodontal infections and cardiovascular disease—how strong is the association? *Oral Diseases* 2000, 6(6), 335–350.

Bainbridge, BW., Darveau, RP.: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontologica Scandinavica* 2001, 59(3), 131–138.

Bansal, T., Pandey, A., Deepa, D., Asthana, AK.: C-reactive protein (CRP) and its association with periodontal disease: a brief review. *Journal of clinical and diagnostic research* 2014, 8(7), 21–24.

Bansal, T., Dhruvakumar, D., Pandey, A.: Comparative evaluation of C-reactive protein in peripheral blood of patients with healthy gingiva, gingivitis and chronic periodontitis: a clinical and particle-enhanced turbidimetric immuno-analysis. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2014, 18(6), 739–743.

Banzon, JM., Rehm, SJ., Gordon, SM., Hussain, ST., Pettersson, GB., Shrestha, NK.: *Propionibacterium acnes* endocarditis: a case series. *Clinical Microbiology and Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017, 23(6), 396-399.

Bascones-Martinez, A., Muñoz-Corcuera, M., Meurman, JH.: Odontogenic infections in the etiology of infective endocarditis. *Cardiovascular & Hematological Disorders* 2009, 9(4), 231-235.

Beck, JD.: Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Annals of periodontology* 1998, 3, 127-141.

Beck, JD., Offenbacher, S.: The association between periodontal disease and cardiovascular disease: A state of the science review. *Annals of periodontal disease* 2001, 16(1), 9-15.

Beck, JD., Eke, P., Heiss, G., Madianos, P., Couper, D., Lin, D., Moss, K., Elter, J., Offenbacher, S.: Periodontal disease and coronary heart disease: a reappraisal of the exposure. *Circulation* 2005, 112(1), 19–24.

Beeson, PB.: Fashions in pathogenic concepts during the present century: autointoxication, focal infection, psychosomatic disease, and autoimmunity. *Perspectives in Biology and Medicine* 1992, 36, 13-23.

Bélanger, M., Rodrigues, PH., Dunn, WA, Jr., Progulske – Fox, A.: Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Autophagy* 2006, 2(3), 165–170.

Billings, F.: Chronic focal infection and their etiologic relations to arthritis and nephritis. *The Archives of Internal Medicine* 1912, 9, 484-498.

Billings, F.: Chronic focal infection as a causative factor in chronic arthritis. *The Journal of the American Medical Association* 1913, 61, 819-823.

Black, S., Kushner, I., Samols, D.: C-reactive protein. *The Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(47), 48487–48490.

Bloemenkamp, DG., van den Bosch, MA., Mali, WP., Tanis, BC., Rosendaal, FR., Kemmeren, JM., Algra, A., Visseren, FL., van der Graaf, Y.: Novel risk factors for peripheral arterial disease in young women. *The American Journal of Medicine* 2002, 113(6), 462–467.

Boillot, A., Demmerc, RT., Mallatd, Z., Saccof, RL., Jacobsg, DR., Benessianoj, J., Tedguid, A., Rundekf, T., Papapanouj, PN., Desvarieuxc, M.: Periodontal microbiota and phospholipases: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Atherosclerosis* 2015, 242(2), 418–423.

Bokhari, SA., Khan, AA., Butt, AK.: Periodontitis in coronary heart disease patients: strong association between bleeding on probing and systemic biomarkers. *Journal of clinical periodontology* 2014, 41(11), 1048–1054.

Bolla, V., Kumari, PS., Munnangi, SR., Kumar, DS., Durgabai, Y., Koppolu, P.: Evaluation of Serum C-reactive Protein Levels in Subjects with Aggressive and Chronic Periodontitis in Comparison with Healthy Controls: A Clinico-biochemical Study. *International Journal of Applied & Basic Medical Research* 2017, 7(2), 121-124.

Bostanci, N.: *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 2012, 333(1), 1-9.

Bouchiat, C., Moreau, K., Devillard, S., Rasigade, JP., Mosnier, A., Geissmann, T., Bes, M., Tristan, A., Lina, G., Laurent, F., Piroth, L., Aissa, N., Duval, X., Le Moing, V., Vandenesch, F., French VIRSTA Study Group.: *Staphylococcus aureus* infective endocarditis versus bacteremia strains: Subtle genetic differences at stake. *Infection, Genetics and Evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2015, 36, 524-530.

Brown, M., Griffin, GE.: Immune responses in endocarditis. *Heart* 1998, 79(1), 1–2.

Buchen, L.: Microbiology: The new germ theory. *Nature* 2010, 468, 492-495.

Burden, DJ., Coulter, WA., Johnston, CD., Mullally, B., Stevenson, M.: The prevalence of bacteraemia on removal of fixed orthodontic appliances. *European Journal of Orthodontics* 2004, 26(4), 443-7.

Copeland, A., Sikorski, J., Lapidus, A., Nolan, M., Del Rio, TG., Lucas, S., Chen, F., Tice, H., Pitluck, S., Cheng, JF., Pukall, R., Chertkov, O., Brettin, T., Han, C., Detter, JC., Kuske, C., Bruce, D., Goodwin, L., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, JA., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyripides, NC., Klenk, HP., Detter, JC.: Complete genome sequence of *Atopobium parvulum* type strain (IPP 1246). *Standards in genomic sciences* 2009, 1(2), 166-73.

Cortelli, JR., Cortelli, SC., Jordan, S., Haraszthy, VI., Zambon, JJ.: Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2005, 32(8), 860-6.

Coykendall, AL.: Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical microbiology reviews* 1989, 2(3), 315–28.

Curtis, MA., Aduse-Opoku, J., Rangarajan, M.: Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2001, 12(3), 192–216.

D'Aiuto, F., Ready, D., Tonetti, MS.: Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *Journal of periodontal research* 2004, 39(4), 236–241.

Dahlén, G., Fiehn, NE., Olsen, I., Dahlgren, U.: *Oral Microbiology and Immunology*, Copenhagen: Munksgaard Denmark, 2012. ISBN: 978-87-628-1371-7.

Dale, BA., Kimball, JR., Krisanaprakornkit, S., Roberts, F., Robinovitch, M., O'Neal, R., Valore, EV., Ganz, T., Anderson, GM., Weinberg, A.: Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *Journal of periodontal research* 2001, 36(5), 285–294.

Daly, CG., Mitchell, DH., Highfield, JE., Grossberg, DE., Stewart, D.: Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *Journal of periodontology* 2001, 72(2), 210–214.

Darveau, RP., Belton, CM., Reife, RA., Lamont, RJ.: Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity* 1998, 66(4), 1660-5.

Drescher, J., Schlafer, S., Schaudinn, C., Riep, B., Neumann, K., Friedmann, A., Petrich, A., Göbel, UB., Moter, A.: Molecular epidemiology and spatial distribution of *Selenomonas spp.* in subgingival biofilms. *European journal of oral sciences* 2010, 118(5), 466–474.

Easlick, KA.: An evaluation of the effect of the dental foci of infection on health. *Journal of the American Dental Association* 1951, 42(6), 612-616.

Eickholz, P., Siegelin, Y., Scharf, S.: Non-surgical periodontal therapy decreases serum elastase levels in aggressive but not in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2013, 40(4), 327–333.

Felner, JM., Dowell, VR Jr.: Anaerobic bacterial endocarditis. *The New England journal of medicine* 1970, 283(22), 1188-92.

Fernandes, CP., Oliveira, FA., Silva, PG., Alves, AP., Mota, MR., Montenegro, RC., Burbano, RM., Seabra, AD., Lobo, Filho, JG., Lima, DL., Soares, Filho, AW., Sousa, FB.: Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. *International journal of cardiology* 2014, 174(3), 710-2.

Fiehn, NE., Gutschik, E., Larsen, T., Bangsberg, JM.: Identity of streptococcal blood isolates and oral isolates from two patients with infective endokarditis. *Journal of clinical microbiology* 1995, 33(5), 1399–1401.

Fiehn, NE., Larsen, T., Christiansen, N., Holmstrup, P., Schroeder, TV.: Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *Journal of periodontology* 2005, 76(5), 731–736.

Fletcher, J., Reddi, K., Poole, S., Nair, S., Henderson, B., Tabona, P., Wilson, M.: Interactions between periodontopathogenic bacteria and cytokines. *Journal of periodontal research* 1997, 32(1 Pt 2), 200-5.

Ford, P., Gemmell, E., Walker, P., West, M., Cullinan, M., Seymour, G.: Characterization of heat shock protein-specific T cells in atherosclerosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2005, 12(2), 259-67.

Ford, PJ., Gemmell, E., Chan, A., Carter, CL., Walker, PJ., Bird, PS., West, MJ., Cullinan, MP., Seymour, GJ.: Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral microbiology and immunology* 2006, 21(4), 206-11.

Ford, PJ., Yamazaki, K., Seymour, GJ.: Cardiovascular and oral disease interactions: what is the evidence? *Primary Dental Care* 2007, 14(2), 59–66.

Forner, L., Nielsen, CH., Bendtzen, K., Larsen, T., Holmstrup, P.: Increased plasma levels of IL-6 in bacteremic periodontitis patients after scaling. *Journal of clinical periodontology* 2006, 33(10), 724–729.

Forner, L., Larsen, T., Kilian, M., Holmstrup, P.: Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *Journal of clinical periodontology* 2006, 33(6), 401-7.

Francke, OC.: William Hunter's "oral sepsis" and American odontology. *Bulletin of the history of dentistry* 1973, 21(2), 73-79.

Freires, IA., Avilés-Reyes, A., Kitten, T., Simpson-Haidaris, PJ., Swartz, M., Knight, PA., Rosalen, PL., Lemos, JA., Abranches, J.: Heterologous expression of *Streptococcus mutans* Cnm in *Lactococcus lactis* promotes intracellular invasion, adhesion to human cardiac tissues and virulence. *Virulence* 2017, 8(1), 18-29.

Gholizadeh, P., Pormohammad, A., Eslami, H., Shokouhi, B., Fakhrzadeh, V., Kafil, HS.: Oral Pathogenesis of *A. actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis* 2017, 113, 303-311.

Giannopoulou, C., Cionca, N., Almaghlouth, A., Cancela, J., Courvoisier, DS., Mombelli, A.: Systemic Biomarkers in 2-Phase Antibiotic Periodontal Treatment: A Randomized Clinical Trial. *Journal of dental research* 2016, 95(3), 349-55.

Gibbons, RV.: Germs, Dr. Billings, and the theory of focal infection. *Clinical infectious diseases* 1998, 27(3), 627-633.

Graziani, F., Cej, S., Tonetti, M.: Systemic inflammation following non-surgical and surgical periodontal therapy. *Journal of clinical periodontology* 2010, 37(9), 848–854.

Goldberg, MH.: Gram-negative bacteremia after dental extraction. *Journal of oral surgery* 1968, 26(3), 180-1.

Goldenberger, D., Künzli, A., Vogt, P., Zbinden, R., Altwegg, M.: Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad – range PCR amplification and direct sequencing. *Journal of clinical microbiology* 1997, 35(11), 2733-9.

Goldstein, I., Rebeyrotte, P., Parlebas, J., Halpern, B.: Isolation from heart valves of glycopeptides which share immunological properties with *Streptococcus haemolyticus* group A polysaccharides. *Nature* 1968, 219(5156), 866-8.

Gomes-Filho, IS., Freitas, Coelho, JM., da Cruz, SS., Passos, JS., Teixeira de Freitas, CO., Aragão, Farias, NS., Amorim da Silva, R., Silva, Pereira, MN., Lima, TL., Barreto, ML.: Chronic periodontitis and C-reactive protein levels. *Journal of periodontology* 2011, 82(7), 969–978.

Gomes, F., Teixeira, P., Oliveira, R.: Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling* 2014, 30(2), 131-141.

Gonçalves, LFH., Fermiano, D., Feres, M., Figueiredo, LC., Teles, FRP., Mayer, MPA., Faveri, M.: Levels of *Selenomonas species* in generalized aggressive periodontitis. *Journal of periodontal research* 2012, 47(6), 711–718.

Gonzales, JR., Groeger, S., Johansson, A., Meyle, J.: T helper cells from aggressive periodontitis patients produce higher levels of interleukin-1 beta and interleukin-6 in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *Clinical oral investigations* 2014, 18(7), 1835-1843.

Goyal, L., Bey, A., Gupta, ND., Sharma, VK.: Comparative evaluation of serum C-reactive protein levels in chronic and aggressive periodontitis patients and association with periodontal disease severity. *Contemporary Clinical Dentistry* 2014, 5(4), 484–488.

Günthard, H., Hany, A., Turina, M., Wüst, J.: *Propionibacterium acnes* as a cause of aggressive aortic valve endocarditis and importance of tissue grinding: case report and review. *Journal of clinical microbiology* 1994, 32(12), 3043-3045.

Guntheroth, WG.: How important are dental procedures as a cause of infective endokarditis? *American journal of cardiology* 1984, 54(7), 797-801.

Hajishengallis, G., Harokopakis, E.: *Porphyromonas gingivalis* interactions with complement receptor 3 (CR3): innate immunity or immune evasion? *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 2007, 12, 4547–4557.

Hayashi, C., Viereck, J., Hua, N., Phinikaridou, A., Madrigal, AG., Gibson FC., Hamilton, JA., Genco, CA.: *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 2011, 215(1), 52-9.

Han, YW.: *F. nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*. 2015, 23, 141–147.

Haraszthy, VI., Zambon, JJ., Trevisan, M., Zeid, M., Genco, RJ.: Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *Journal of periodontology* 2000, 71(10), 1554-60.

Haraszthy, VI., Gerber, D., Clark, B., Moses, P., Parker, C., Sreenivasan, PK., Zambon, JJ.: Characterization and prevalence of *Solobacterium moorei* associated with oral halitosis. *Journal of breath research* 2008, 2(1), 017002.

Henderson, B., Nair, SP., Ward, JM., Wilson, M.: Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual review of mikrobiology* 2003, 57, 29-55.

Herzberg, MC., Brintzenhofe, KL., Clawson, CC.: Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguinis*. *Infection and immunity* 1983, 39(3), 1457–69.

Herzberg, MC.: Platelet-streptococcal interactions in endocarditis. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1996, 7(3), 222–36.

Highfield, J.: Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal* 2009, 54(1), 11–26.

Hollenbeck, BL., Gannon, S., Qian, Q., Grad, Y.: Genome sequence and analysis of resistance and virulence determinants in a strain of *Neisseria mucosa* causing native-valve endocarditis. *JMM Case reports* 2015, 2(3), 345-350.

Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, 299(5609), 1057–61.

Hujoel, PP., Drangsholt, M., Spiekerman, C., DeRouen, TA.: Periodontal disease and coronary heart disease risk. *Journal of the American Medical Association* 2000, 284(11), 1406–1410.

Hunter, WD.: Oral sepsis as a cause of disease. *British medical journal* 1900 2(2065), 215-216.

Hunter, W.: The role of sepsis and antisepsis in medicine and the importance of oral sepsis as its chief cause. *Dental register* 1911, 44, 579-611.

Chalupova, M., Skalova, A., Hajek, T., Geigerova, L., Kralova, D., Liska, P., Hecova, H., Molacek, J., Hrabak, J.: Bacterial DNA detected on pathologically changed heart valves using 16S rRNA genamplification. *Folia microbiologica* 2018, 63(6), 707-711.

Chandy, S., Joseph, K., Sankaranarayanan, A., Issac, A., Babu, G., Wilson, B., Joseph, J.: Evaluation of C-Reactive Protein and Fibrinogen in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis: A Clinico-Biochemical Study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR* 2017, 11(3), 41-45.

Chang, JS., Tsai, CR., Chen, LT., Shan, YS.: Investigating the Association Between Periodontal Disease and Risk of Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2016, 45(1), 134-41.

Chapple, ILC., Genco, R., working group 2 of the joint EFP/AAP workshop.: Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of periodontology* 2013, 40(14), 106-112.

Chen, H., Zheng, P., Zhu, H., Zhu, J., Zhao, L., El Mokhtari, NE., Eberhard, J., Lins, M., Jepsen, S.: Platelet-activating factor levels of serum and gingival crevicular fluid in nonsmoking patients with periodontitis and/or coronary heart disease. *Clinical oral investigations* 2010, 14(6), 629-636.

Chen, HH.: Periodontitis exposure within one year before anti-diabetic treatment and the risk of rheumatoid arthritis in diabetes mellitus patients: a population-based cohort study. *Revista brasileira de reumatologia* 2014, 54(2), 124-130.

Chen, XT., Chen, LL., Tan, JY., Shi, DH., Ke, T., Lei, LH.: Th17 and Th1 Lymphocytes Are Correlated with Chronic Periodontitis. *Immunological investigations* 2016, 45(3), 243-54.

Chopra, R., Patil, SR., Kalburgi, NB., Mathur, S.: Association between alveolar bone loss and serum C-reactive protein levels in aggressive and chronic periodontitis patients. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2012, 16(1), 28–31.

Choi, J., Lee, SY., Kim, K., Choi, BK.: Identification of immunoreactive epitopes of the *Porphyromonas gingivalis* heat shock protein in periodontitis and atherosclerosis. *Journal of periodontal research* 2011, 46(2), 240-5.

Chung, SW., Kang, HS., Park, HR., Kim, SJ., Kim, SJ., Choi, JI.: Immune responses to heat shock protein in *Porphyromonas gingivalis* – infected periodontitis and atherosclerosis patients. *Journal of periodontal research* 2003, 38(4), 388-93.

Chung, WO., Dommisch, H., Yin, L., Dale, BA.: Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Current pharmaceutical design* 2007, 13(30), 3073–3083.

Ingaki, S., Kamizuka, S.: *Treponema denticola* invasion into human gingival epithelial cells. *Microbial pathogenesis* 2016, 94, 104-111.

Jalava, J., Kotilainen, P., Nikkari, S., Skurnik, M., Vääntinen, E., Lehtonen, OP., Eerola, E., Toivanen, P.: Use of the polymerase chain reaction and DNA sequencing for detection of *Bartonella quintana* in the aortic valve of a patient with culture-negative infective endocarditis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1995, 21(4), 891-6.

Jayaprakash, D., Aghanashini, S., Chatterjee, A., Bharwani, A., Vijayendra, R., Rosh, R.: Effect of periodontal therapy on C-reactive protein levels in gingival crevicular fluid of patients with gingivitis and chronic periodontitis: a clinical and biochemical study. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2014, 18(4), 456–460.

Jie, Z., Xia, H., Zhong, SL., Feng, Q., Li, S., Liang, S., Zhong, H., Liu, Z., Gao, Y., Zhao, H., Zhang, D., Su, Z., Fang, Z., Lan, Z., Li, J., Xiao, L., Li, J., Li, R., Li, X., Li, F., Ren, H., Huang, Y., Peng, Y., Li, G., Wen, B., Dong, B., Chen, JY., Geng, QS., Zhang, ZW., Yang, H., Wang, J., Wang, J., Zhang, X., Madsen, L., Brix, S., Ning, G., Xu, X., Liu, X., Hou, Y., Jia, H., He, K., Kristiansen, K.: The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature communications* 2017, 8(1), 845.

Jordan, HV., Keyes, PH.: Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Archives of Oral Biology* 1964, 9(4), 401–414.

Jordan, HV., Fitzgerald, RJ., Stanley, HR.: Plaque formation and periodontal pathology in gnotobiotic rats infected with an oral actinomycete. *The American journal of pathology* 1965, 47(6), 1157–1167.

Jun, HK., Jung, YJ., Choi, BK.: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia* induce cell death and release of endogenous danger signals. *Archives of Oral Biology* 2017, 73, 72-78.

Kalburgi, V., Sravya, L., Warad, S., Vijayalaxmi, K., Sejal, P., Hazeil, D.: Role of systemic markers in periodontal diseases: a possible inflammatory burden and risk factor for cardiovascular diseases? *Annals of medical and health sciences research* 2014, 4(3), 388–392.

Kells, CE.: The X-ray in dental practice: the crime of the age. *The Journal of the National Dental Association* 1920, 7(3), 241-272.

Kilian, M., Schiott, CR.: Haemophili and related bacteria in the human oral cavity. *Archives of oral biology* 1975, 20(12), 791-6.

Kilian, M., Chapple, IL., Hannig, M., Marsh, PD., Meuric, V., Pedersen, AM., Tonetti, MS., Wade, WG., Zaura, E.: The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British dental journal* 2016, 221(10), 657-666.

Kinane, DF., Galicia, JC., Gorr, SU., Stathopoulou, PG., Benakanakere, M.: *Porphyromonas gingivalis* interactions with epithelial cells. *Frontiers in bioscience* 2008, 13(3), 966–984.

Kinane, DF., Shiba, H., Hart, TC.: The genetic basis of periodontitis. *Periodontology* 2000 2005, 39, 91–117.

Koppolu, P., Durvasula, S., Palaparthi, R.: Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *The Pan African medical journal* 2013, 15, 92.

Kolltveit, KM., Geiran, O., Tronstad, L., Olsen I.: Multiple bacteria in calcific aortic valve stenosis. *Microbial ecology in health and disease* 2009, 14(2), 110-117.

Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, CJ., Knight, R., Fagerberg, B., Ley, RE., Bäckhed, F.: Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108(1), 4592-8.

Krishnan, K., Chen, T., Paster, BJ.: A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral diseases* 2017, 23(3), 276-286.

Kozarov, E.: Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. *Future cardiology* 2012, 8(1), 123–138.

Kupferwasser, LI., Bayer, AS.: Update on culture-negative endocarditis. *Current clinical topics in infectious diseases* 2000, 20, 113-33.

Kurihara, N., Inoue, Y., Iwai, T., Umeda, M., Huang, Y., Ishikawa, I.: Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular surgery* 2004, 28(5), 553-8.

Lalla, E.: Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003, 23(8), 1405-11.

Leishman, S.J., Ford, P.J., Do, H.L.: Periodontal pathogen load and increased antibody response to heat shock protein 60 in patients with cardiovascular disease. *Journal of clinical periodontology* 2012, 39(10), 923–930.

León, R., Silva, N., Ovalle, A., Chaparro, A., Ahumada, A., Gajardo, M., Martinez, M., Gamonal, J.: Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the amniotic fluid in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *Journal of periodontology* 2007, 78(7), 1249-55.

Libby, P., Ridker, P.M., Maseri.: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105(9), 1135–1143.

Libby, P.: Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology* 2009, 54(23), 2129–2138.

Linden, G.J., McClean, K., Young, I., Evans, A., Kee, F.: Persistently raised C-reactive protein levels are associated with advanced periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2008, 35(9), 741–747.

Linden, G.J., Lyons, A., Scannapieco, F.A.: Periodontal systemic associations: review of the evidence. *Journal of clinical periodontology* 2013, 40(14), 8–19.

Lockhart, P.B., Brennan, M.T., Sasser, H.C., Fox, P.C., Paster, B.J., Bahrani-Mougeot, F.K.: Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* 2008, 117(24), 3118-3125.

Lockhart, PB., Bolger, AF., Papapanou, PN., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, ME., Taubert, KA., Newburger, JW., Gornik, HL., Gewitz, MH., Wilson, WR., Smith, SC Jr., Baddour, LM., American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, and Council on Clinical Cardiology.: Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2012, 125(20), 2520–2544.

Löe, H., Theilade, E., Börglum, Jensen, S.: Experimental gingivitis in man. *Journal of periodontology* 1965, 36(3), 177-187.

Loesche, WJ.: Anaerobic periodontal infections as risk factors for medical disease. *Current Infectious Disease Reports* 1999,1(1), 33-38.

Loos, BG., Craandijk, J., Hoek, FJ., Wertheim-van Dillen, PME., van der Velden, U.: Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of periodontology* 2000, 71(10), 1528–1534.

López, R., Baelum, V., Hedegaard, CJ., Bendtzen, K.: Serum levels of C-reactive protein in adolescents with periodontitis. *Journal of periodontology* 2011, 82(4), 543–549.

Lorber, B.: Are all diseases infectious? Another look. *Annals of internal medicine* 1999, 131(12), 989-990.

Lowrance, JH., Hasty, DL., Simpson, WA.: Adherence of *Streptococcus sanguinis* to conformationally specific determinants in fibronectin. *Infection and immunity* 1988, 56(9), 2279–85.

Madianos, PM., Bobetsis, YA., Kinane, DF.: Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of clinical periodontology* 2005, 32(6), 57–71.

Maeda, H., Miyamoto, M., Kokeyuchi, S., Kono, T., Nishimura, F., Takashiba, S., Murayama, Y.: Epitope mapping of heat shock protein 60 (GroEL) from *Porphyromonas gingivalis*. FEMS immunology and medical microbiology 2000, 28(3), 219-24.

Maharaj, B., Coovadia, Y., Vayej, AC.: An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. Cardiovascular journal of Africa 2012, 23(6), 340-4.

Maleki, F., Khosravi, A., Nasser, A., Taghinejad, H., Azizian, M.: Bacterial heat shock protein activity. Journal of clinical and diagnostic research 2016, 10(3), 1–3.

Marcaccini, AM., Meschiari, CA., Sorgl, CA.: Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. Journal of periodontology 2009, 8(4), 594–602.

McLaughlin, JO., Coulter, WA., Coffey, A., Burden, DJ.: The incidence of bacteremia after orthodontic banding. American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics: official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics 1996, 109(6), 639–644.

Medzhitov, R.: Toll-like receptors and innate immunity. Nature reviews immunology 2001, 1(2), 135–145.

Mergenhagen, SE., de Araujo, WC., Varah, E.: Antibody to *Leptotrichia buccalis* in human sera. Archives of oral biology 1965, 10(1), 29–33.

Miller, WD.: The Micro-Organisms of the Human Mouth: The Local and General Diseases which are Caused by them. S.S. White, Philadelphia, 1890. ISBN: 978-3-8055-1614-3

Miller, WD.: The human mouth as a focus of infection. The Lancet 1891, 138(3546), 340-342.

Mlynek, V., Skoczynska, A.: The proinflammatory activity of cadmium. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej* 2005, 59, 1-8.

Moreno, S., Parra, B., Botero, JE., Moreno, F., Vásquez, D., Fernández, H., Alba, S., Gallego, S., Castillo, G., Contreras, A.: Periodontal microbiota and microorganisms isolated from heart valves in patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali, Colombia. *Biomedica* 2017, 37(4), 516-525.

Mougeot, JC., Stevens, CB., Paster, BJ., Brennan, MT., Lockhart, PB., Mougeot, FK.: *Porphyromonas gingivalis* is the most abundant species detected in coronary and femoral arteries. *Journal of oral microbiology* 2017, 9(1), 1281562.

Murphy, AM., Daly, CG., Mitchell, DH., Stewart, D., Curtis, BH.: Chewing fails to induce oral bacteraemia in patients with periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2006, 33(10), 730–736.

Murray, CA., Saunders, WP.: Root canal treatment and general health: a review of the literature. *International endodontic journal* 2000, 33(1), 1-18.

Musalaiah, SV., Anupama, M., Nagasree, M., Krishna, CM., Kumar, A., Kumar, P.: Evaluation of nonsurgical periodontal therapy in chronic periodontitis patients with anemia by estimating hematological parameters and high-sensitivity C-reactive protein levels. *Journal of pharmacy and bioallied sciences* 2014, 6(5), 64–69.

Mustapha, IZ., Debrey, S., Oladubu, M., Ugarte, R.: Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology* 2007, 78(12), 2289-302.

Nakamoto, H., Fujita, K., Ohtaki, A., Watanabe, S., Narumi, S., Maruyama, T., Suenaga, E., Misono, TS., Kumar, PK., Goloubinoff, P., Yoshikawa, H.: Physical interaction between bacterial heat shock protein (HSP) 90 and HSP70 chaperones mediates their cooperative action to refold denatured proteins. *The Journal of biological chemistry* 2014, 289(9), 6110–19.

Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeuchi, H., Yoshioka, H., Toda, K., Taniguchi, K., Amano, A., Ooshima, T.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. Oral microbiology and immunology 2008, 23(2), 170-2.

Nakano, K., Inaba, H., Nomura, R., Nemoto, H., Takeda, M., Yoshioka, H., Matsue, H., Takahashi, T., Taniguchi, K., Amano, A., Ooshima, T.: Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. Journal of clinical microbiology 2006, 44(9), 3313–3317.

Nakano, K., Nemoto, H., Nomura, R., Inaba, H., Yoshioka, H., Taniguchi, K., Amano, A., Ooshima, T.: Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. Oral microbiology and immunology 2009, 24(1), 64-8.

Nataloni, M., Pergolini, M., Rescigno, G., Mocchegiani, R.: Prosthetic valve endocarditis. Journal of cardiovascular medicine 2010, 11(12), 869–883.

Navas-Acien, A., Selvin, E., Sharrett, AR., Calderon-Aranda, E., Silbergeld, E., Guallar, E.: Lead cadmium, smoking, and increased risk of peripheral arterial disease. Circulation 2004, 109(25), 3196-201.

Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P., Carranza, FA.: Carranza's Clinical Periodontology. St. Louis USA: Elsevier Saunders., 2012. 11th edition. ISBN: 9780323188241.

Nguyen, CM., Kim, JWM., Quan, VH., Nguyen, BH., Tran, SD.: Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. Journal of oral biology and craniofacial research 2015, 5(3), 203-206.

Noack, B., Genco, RJ., Trevisan, M., Grossi, S., Zambon, JJ., DeNardin, E.: Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. Journal of periodontology 2001, 72(9), 1221–1227.

Okuda, K., Ishihara, K., Nakagawa, T., Hirayama, A., Inayama, Y., Okuda, K.: Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. Journal of clinical microbiology 2001, 39(3), 1114-7.

Oliveira, FA., Forte, CP., Silva, PG., Lopes, CB., Montenegro, RC., Santos, ÂK., Sobrinho, CR., Mota, MR., Sousa, FB., Alves, AP.: Molecular analysis of oral bacteria in heart valve of patients with cardiovascular disease by real-time polymerase chain reaction. *Medicine (Baltimore)* 2015, 94(47), e2067.

Olsen, I., Progulske-Fox, A.: Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. *Journal of oral microbiology* 2015, 31(7), 28788.

Ott, SJ., El, Mokhtari, NE., Musfeldt, M., Hellmig, S., Freitag, S., Rehman, A., Kühbacher, T., Nikolaus, S., Namsolleck, P., Blaut, M., Hampe, J., Sahly, H., Reinecke, A., Haake, N., Günther, R., Krüger, D., Lins, M., Herrmann, G., Fölsch, UR., Simon, R., Schreiber, S.: Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation* 2006, 113(7), 929-37.

Page, RC.: Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *Journal of periodontal research* 1999, 34(7), 331-9.

Pallash, TJ., Slots, J.: Oral microorganisms and cardiovascular disease. *Journal of the California Dental Association* 2000, 28(3), 204-214.

Pallash, TJ., Wahl, MJ.: The focal infection theory: appraisal and reappraisal. *Journal of the California Dental Association* 2000, 28(3), 194-200.

Pasceri, V., Willerson, JT., Yeh, ET.: Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000, 102(18), 2165-8.

Pávek, V., Broukal, Z.: The clinical significance of bacteremia following tooth extraction. *Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde mit Zentralblatt* 1990, 78(5), 403–406.

Peacock, ME., Carson, RE.: Frequency of self-reported medical conditions in periodontal patients. *Journal of periodontology* 1995, 66(11), 1004–1007.

Perry, A., Lambert, P.: *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. *Expert review of anti-infective therapy* 2014, 9(12), 1149-1156.

Pietiäinen, M., Kopra, KAE., Vuorenkoski, J., Salminen, A., Paju, S., Mäntylä, P., Buhlin, K., Liljestrand, JM., Nieminen, MS., Sinisalo, J., Hyvärinen, K., Pussinen, PJ.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes associate with periodontal and coronary artery disease status. *Journal of clinical periodontology* 2018, 45(4), 413-421.

Pilmis, B., Lefort, A., Lecuit, M., Join-Lambert, O., Nassif, X., Lortholary, O., Charlier, C.: Endocarditis due to *Neisseria mucosa*: case report and review of 21 cases: a rare and severe cause of endocarditis. *The Journal of infection* 2014, 68(6), 601-4.

Pradeep, AR., Manjunath, RG., Kathariya, R.: Progressive periodontal disease has a simultaneous incremental elevation of gingival crevicular fluid and serum CRP levels. *Journal of investigative and clinical dentistry* 2010, 1(2), 133–138.

Pussinen, PJ., Alfthan, G., Tuomilehto, J., Jousilahti, SP.: High serum antibody levels to *Porphyromonas gingivalis* predict myocardial infarction. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation: official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 2004, 11(5), 408-411.

Radafshar, G., Shad, B., Ariamajd, E., Geranmayeh, S.: Effect of intensive non-surgical treatment on the level of serum inflammatory markers in advanced periodontitis. *Journal of dentistry* 2010, 7(1), 24–30.

Radwan-Oczko, M., Jaworski, A., Duś, I., Plonek, T., Szulc, M., Kustrzycki, W.: *P. gingivalis* in periodontal pockets and heart valves. *Virulence* 2014, 5(4), 575-580.

Raffaelli, L., Santangelo, R., Falchetti, P., Galluccio, F., Luciani, N., Anselmi, A., Nowzari, H., Verdugo, F., Fadda, G., D'Addona, A.: Examination of periodontal pathogens in stenotic valve specimens and in whole blood samples in patients affected by aortic valve stenosis and chronic periodontitis. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2010, 23(2), 561-6.

Rajasuo, A., Nyfors, S., Kanervo, A., Jousimies-Somer, H., Lindqvist, C., Suuronen, R.: Bacteremia after plate removal and tooth extraction. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2004, 33(4), 356–360.

Ramich, T., Asendorf, A., Nickles, K., Oremek, GM., Schubert, R., Nibali, L., Wohlfeil, M., Eickholz, P.: Inflammatory serum markers up to 5 years after comprehensive periodontal therapy of aggressive and chronic periodontitis. *Clinical Oral Investigations* 2018, 22(9), 3079-3089.

Reis, LC., Rôças, IN., Siqueira, JF Jr., de Uzeda, M., Lacerda, VS., Domingues, R., Miranda, KR., Saraiva, RM.: Bacteremia after supragingival scaling and dental extraction: Culture and molecular analyses. *Oral diseases* 2018, 24(4), 657-663.

Richmond, PA.: American attitudes toward the germ theory of disease (1860-1880). *Journal of the history of medicine and allied sciences* 1954, 4, 428-454.

Rizzo, M., Cappello, F., Marfil, R., Nibali, L., Marino Gammazza, AM., Rappa, F., Bonaventura, G., Galindo-Moreno, P., O'Valle, F., Zummo, G., Conway de Macario, E., Macario, AJL., Mesa, F.: Heat-shock protein 60 kDa and atherogenic dyslipidemia in patients with untreated mild periodontitis: a pilot study. *Cell stress and chaperones* 2012, 17(3), 399–407.

Roberts, GJ.: Dentists are innocent! „Everyday“ bacteremia is a real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatric Cardiology* 1999, 20(5), 317-325.

Ross, R., Glomset, JA.: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973, 180(4093), 1332-9.

Rufail, ML.: Atherogenic lipoprotein parameters in patients with aggressive periodontitis. *Journal of periodontal research* 2007, 42(6), 495-502.

Safar Iqbal, P., Nubesh, Khan, S., Haris, M., Narayanan, M., Laju, S., Kumar, SS.: Assessment of systemic inflammatory markers in patients with aggressive periodontitis. *Journal of international oral health* 2015, 7(2), 48–51.

Saito, A., Ingaki, S., Kimizuka, R., Okuda, K., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Ishihara, K.: *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2008, 54(3), 349–355.

Saladi, L., Zeana, C., Singh, M.: Native Valve Endocarditis due to *Veillonella Species*: A Case Report and Review of the Literature. Case Reports in Infectious Diseases 2017, 4896186.

Salzberg, TN., Overstreet, BT., Rogers, JD., Califano, JV., Best, AM., Schenkein, HA.: C-reactive protein levels in patients with aggressive periodontitis. Journal of periodontology 2006, 77(6), 933–939.

Scannapieco, F., Genco, R.: Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. Journal of periodontal research 1999, 34(7), 340-345.

Schaefer, AS., Richter, GM., Groessner-Schreiber, B., Noack, B., Nothnagel, M., El, Mokhtari, NE., Loos, BG., Jepsen, S., Schreiber, S.: Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. PLOS genetics 2009, 5(2), e1000378.

Serra e Silva, Filho, W., Casarin, RC., Nicoleta, EL J., Passos, HM., Sallum AW., Gonçalves, RB.: Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. PLoS one 2014, 9(10), e109761.

Seymour, GJ., Ford, PJ., Cullinan, MP., Leishman, S., Yamazaki, K.: Relationship between periodontal infections and systemic disease. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2007, 13(4), 3-10.

Seshadri, R., Myers, GS., Tettelin, H., Eisen, JA., Heidelberg, JF., Dodson, RJ., Davidsen, TM., DeBoy, RT., Fouts, DE., Haft, DH., Selengut, J., Ren, Q., Brinkac, LM., Madupu, R., Kolonay, J., Durkin, SA., Daugherty, SC., Shetty, J., Shvartsbeyn, A., Gebregeorgis, E., Geer, K., Tsegaye, G., Malek, J., Ayodeji, B., Shatsman, S., McLeod, MP., Smajs, D., Howell, JK., Pal, S., Amin, A., Vashisth, P., McNeill, TZ., Xiang, Q., Sodergren, E., Baca, E., Weinstock, GM., Norris, SJ., Fraser, CM., Paulsen, IT.: Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004, 101(15), 5646-51.

Sha, YQ.: Association between periodontitis and preterm low birth weight. Beijing da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Peking University. Health sciences 2009, 41(1), 117-20.

Shapira, L., Champagne, C., van Dyke, TE., Amar, S.: Strain-dependent activation of monocytes and inflammatory macrophages by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. Infection and immunity 1998, 66(6), 2736–2742.

Sharma, A.: Virulence mechanisms of *Tanarella forsythia*. Periodontology 2000 2010, 54(1), 106-116.

Shi, Y., Tokunaga, O.: Herpesvirus (HSV-1, EBV and CMV) infections in atherosclerotic compared with non-atherosclerotic aortic tissue. Pathology international 2002, 52(1), 31-39.

Shrihari, TG., Vasudevan, V., Manjunath, V., Devaraju, D.: Potential Co-Relation Between Chronic Periodontitis and Cancer - An Emerging Concept. The Gulf Journal of oncology 2016, 1(20), 20-24.

Shojaee, M., Fereydooni, Golpasha, M., Maliji, G., Bijani, A., Aghajanpour, Mir, SM., Mousavi, Kani, SN.: C-reactive protein levels in patients with periodontal disease and normal subjects. International Journal of Molecular and Cellular Medicine 2013, 2(3), 151–155.

Smith, RG.: Gingival recession: reappraisal of an enigmatic condition and a new index for monitoring. Journal of clinical periodontology 1997, 24(3), 201–205.

Socransky, SS., Haffajee, AD., Cugini, MA., Smith, C., Kent, RL.: Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology* 1998, 25(2), 134-44.

Stelzel, M., Conrads, G., Pankuweit, S., Maisch, B., Vogt, S., Moosdorf, R., Flores-de-Jacoby, L.: Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in aortic tissue by PCR. *Journal of periodontology* 2002, 73(8), 868-70.

Stewart, R., West, M.: Increasing evidence for an association between periodontitis and cardiovascular disease. *Circulation* 2016, 133(6), 549-551.

Strandberg, TE., Tilvis, RS.: C-reactive protein, cardiovascular risk factors, and mortality in a prospective study in the elderly. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000, 20(4), 1057–1060.

Strom, BL., Abrutyn, E., Berlin, JA., Kinman, JL., Feldman, RS., Stolley, PD., Levison, ME., Korzeniowski, OM., Kaye, D.: Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis. A population-based, case-control study. *Annals of internal medicine*. 1998, 129(10), 761-769.

Sun, XJ., Meng, HX., Shi, D.: Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *Journal of periodontal research* 2009, 44(3), 311–316.

Sundqvist, G., Carlsson, J., Herrmann, B., Tarnvik, A.: Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *Journal of medical microbiology* 1985, 19(1), 85–94.

Szulc, M., Kustrzycki, W., Janczak, D., Michalowska, D., Baczynska, D., Radwan-Oczko, M.: Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous plaques from coronary and carotid arteries. *BioMed research international* 2015, 825397.

Tabeta, K., Yamazaki, K., Hotokezaka, H., Yoshie, H., Hara, K.: Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. *Clinical and experimental immunology* 2000, 120(2), 285–293.

Tada, H., Sugawara, S., Nemoto, E., Takahashi, N., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J., Shimauchi, H., Takada, H.: Proteolysis of CD14 on human gingival fibroblasts by arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* leading to downregulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production. *Infection and immunity* 2002, 70(6), 3304–3307.

Tada, H., Sugawara, S., Nemoto, E., Imamura, T., Potempa, J., Travis, J., Shimauchi, H., Takada, H.: Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains. *Journal of dental research* 2003, 82(10), 796–801.

Tattevin, P., Watt, G., Revest, M., Arvieux, C., Fournier, PE.: Update on blood culture-negative endocarditis. *Médecine et maladies infectieuses* 2015, 45(1-2), 1-8.

Taylor-Robinson, D., Aduse-Opoku, J., Sayed, P., Slaney, JM., Thomas, BJ., Curtis, MA.: Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 2002, 21(10), 755-7.

Tillett, WS., Francis, T.: Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *Journal of experimental medicine* 1930, 52(4), 561–571.

Tomás, I., Alvarez, M., Limeres, J., Potel, C., Medina, J., Diz, P.: Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral diseases* 2007, 13(1), 56–62.

Tonetti, MS.: Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *Journal of clinical periodontology* 2009, 36(10), 15-19.

Tonetti, MS., van Dyke, TE., working group 1 of the joint EFP/AAP workshop.: Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases *Journal of periodontology* 2013, 84(4), 24-9.

Travis, J., Pike, R., Imamura, T., Potempa, J.: *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *Journal of periodontal research* 1997, 32(1), 120–125.

Tronel, H., Chaudemanche, H., Pechier, N., Doutrelant, L., Hoen, B.: Endocarditis due to *Neisseria mucosa* after tongue piercing. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001, 7(5), 275-276.

Tubiana, S., Blotière, P.O., Hoen, B., Lesclous, P., Millot, S., Rudant, J., Weill, A., Coste, J., Alla, F., Duval, X.: Dental procedures, antibiotic prophylaxis, and endocarditis among people with prosthetic heart valves: nationwide population based cohort and a case crossover study. *BMJ: British medical journal / British Medical Association* 2017, 358, j3776.

Valtonen, V.V.: Role of infections in atherosclerosis. *American heart journal* 1999, 138(5), 431-3.

Van Dyke, T.E., Horoszewicz, H.U., Cianciola, L.J., Genco, R.J.: Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infection and immunity* 1980, 27(1), 124–132.

Van Dyke, T.E., Van Winkelhoff, A.J.: Infection and inflammatory mechanisms. *Journal of clinical periodontology* 2013, 40(14), 1–7.

Van Valen, R., de Lind van Wijngaarden, R.A., Verkaik, N.J., Mokhles, M.M., Bogers, A.J.: Prosthetic valve endokarditis due to *Propionibacterium acnes*. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2016, 23(1), 150-5.

Weidlich, P., Cimoës, R., Pannuti, C.M., Oppermann, R.V.: Association between periodontal diseases and systemic diseases. *Brazilian oral research* 2008, 22(1), 32–43.

Werdan, K., Dietz, S., Löffler, B., Niemann, S., Bushnaq, H., Silber, R.E., Peters, G., Müller-Werdan, U.: Mechanisms of infective endokarditis: pathogen – host interaction and risk states. *Nature review cardiology* 2014, 11(1), 35-50.

Wick, G.: Atherosclerosis an autoimmune disease due to an immune reaction against heat-shock protein 60. *Herz* 2000, 25(2), 87-90.

Wick, G., Perschinka, H., Millonig, G.: Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends in immunology* 2001, 22(12), 665–669.

Wohlfeil, M., Scharf, S., Siegelin, Y.: Increased systemic elastase and C-reactive protein in aggressive periodontitis (CLOI-D-00160R2). *Clinical oral investigations* 2012, 16(4), 1199–1207.

World, Health, Organization.: *Oral Health Surveys – Basic Methods*. Geneva, Switzerland, 2013. 5th edition, ISBN 978-92-4-154864-9.

Wu, J., Peters, B., Dominianni, C., Zhang, Y., Pei, Z., Yang, L., Ma, Y., Purdue, M., Jacobs, E., Gapstur, SM., Li, H., Alekseyenko, AV., Hayes, RB., Ahn, J.: Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of American adults. *Multidisciplinary journal of microbial ecology* 2016, 10(10), 2435-46.

Yamazaki, K., Ohsawa, Y., Tabet, K.: Accumulation of human heat shock protein 60 - reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Infection and immunity* 2002, 70(5), 2492–2501.

Yamazaki, K., Nakajima, T.: Antigen specificity and T-cell clonality in periodontal disease. *Periodontology* 2000 2004, 35(1), 75–100.

Yilmaz, O.: The chronicles of *P. gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology* 2008, 154(10), 2897–2903.

Zhang, J., Dong, H., Kashket, S., Duncan, MJ.: IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microbial pathogenesis* 1999, 26(5), 275–280.

Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., Yang, W.: Interleukin-10 inhibits bone resorption: potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed research international* 2014, 284836.

Zhou, SY., Duan, XQ., Hu, R., Ouyang, XY.: Effect of nonsurgical periodontal therapy on serum levels of TNF- α , IL-6 and C-reactive protein in periodontitis subjects with stable coronary heart disease. *The Chinese journal of dental research: the official journal of the Scientific Section of the Chinese Stomatological Association (CSA)* 2013, 16(2), 145–151.

Zhou, X., Han, J., Liu, Z., Song, Y., Wang, Z., Sun, Z.: Effects of periodontal treatment on lung function and exacerbation frequency in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic periodontitis: a 2-year pilot randomized controlled trial. *Journal of clinical periodontology* 2014, 41(6), 564-72.

Ziebolz, D., Jahn, C., Pegel, J., Semper-Pinnecke, E., Mausberg, RF., Waldmann-Beushausen, R., Schöndube, FA., Danner, BC.: Periodontal bacteria DNA findings in human cardiac tissue - Is there a link of periodontitis to heart valve disease? *International journal of cardiology* 2018, 251, 74-79.

Žák, A., Macášek, J., Slabý, A., Staňková, B., Tvrzická, B., Vařeka, T., Vecka, M., Vítek, L., Zeman, M., *Ateroskleróza*. Praha: Grada Publishing, 2011. 192 s. ISBN 978-80-247-3052-3.

1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30–November 2, 1999. *Annals of periodontology* 1999, 4(1), 1–112.