

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**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**

MUDr. Jaroslav Myšák

Praha, 2019

Doktorské studijní programy v biomedicíně

**Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd
České republiky**

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Stomatologická klinika 1. LF UK, Kateřinská
32, Praha 2, 128 01

Autor: MUDr. Jaroslav Myšák

Školitel: prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc. (2010-2017)
prof. MUDr. et MUDr. René Foltán, Ph.D.
(2017-2019)

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

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) přítom 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. 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

Abstrakt	3
Abstract (AJ)	4
1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle	6
3. Experimentální část I	7
4. Experimentální část II	9
5. Experimentální část III	10
6. Výsledky experimentální části I	11
7. Výsledky experimentální části II	13
8. Výsledky experimentální části III	14
9. Diskuse	15
10. Závěr	17
11. Použitá literatura	17
Seznam publikací doktoranda	20

1. Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou obecně považována za jednu z nejčastějších příčin úmrtí. Mezi rizikové faktory patří poruchy látkové výměny 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 i dalších onemocnění KVS uvažovány i mikroorganismy, zejména mikrobiální flóra střeva a dutiny ústní [Koren et al., 2011, Tonetti et al., 2013]. 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]. Orální bakterie jsou tedy nejen hlavním etiologickým faktorem parodontitidy, ale mohly by být i vedlejším rizikovým faktorem některých KVO, například aterosklerózy a infekční endokarditis. 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 – C reaktivní protein (CRP), leukocyty, procalcitonin, $\alpha 1$ – kyselý glykoprotein (orosomukoid), fibrinogen, $\alpha 1$ – antitrypsin, haptoglobin, C3 a C4 složky komplementu, ceruloplazmin aj. Především CRP je intenzivně studován v korelaci mezi parodontitidou a KVO, jelikož elevace CRP je popisována v souvislosti s oběma onemocněními [Kalburgi, 2014].

2. Hypotézy a 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. Experimentální část I

Metodika

Metodika experimentu vychází z identifikace bakteriální DNA ve vzorcích aortální či mitrální chlopně. Do této experimentální části bylo zařazeno v 1. experimentální skupině 20 pacientů s aortální či mitrální stenózou, u kterých je plánován kardiochirurgický výkon – náhrada aortální či mitrální chlopně, 2. kontrolní skupina (15 pacientů) obsahovala jedince, kteří neměli postižení parodontu, ale neměli ani klinické příznaky kardiovaskulárního onemocnění. Pacienti byli do studie zařazeni v souladu s principy Helsinské deklarace, 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 (bleeding on probing). 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.

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.

Indikaci k elektivním kardiochirurgickým výkonům zajišťovala II. chirurgická klinika kardiiovaskulární 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 neprojevalo 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 povoláním 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 od 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 chlopněvého materiálu. Pro určení mikrobiálních profilů byla použita metoda pyrosekvenování (metoda 454 sekvenování). Četnost výskytu jednotlivých sekvencí ve vzorku do jisté míry ukázala i kvantitu zastoupení příslušného mikroorganismu. Výsledky pro jednotlivé odběry byly porovnávány a byla posuzována souvislost mikrobiálního osídlení parodontu a chlopněvého materiálu.

4. 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

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

Pacienti s gingiválními recesy, jakožto nezávěsným onemocněním parodontu, tvořili v experimentu kontrolní skupinu.

Hodnocení parodontu

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

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

Hloubka sondáže byla hodnocena WHO parodontologickou sondou o délce 11,5 mm metodou “walking probe” na všech zubech. Krvácení po sondáži (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: papilla bleeding index (PBI) a clinical attachment loss (CAL)

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.

5. 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. 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 lokalizovanou či generalizovanou 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 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].

6. 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, s ohledem na ukončení studie, zpracovávány vůbec. 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. Pro druhou fázi zpracování vzorků (vzorky 9-12) byla metoda izolace DNA modifikována (grafy 1-4 viz. disertační práce). *P. gingivalis* byla identifikována také ve všech čtyřech vzorcích z druhé fáze sekvenování (9-12) spolu s dalšími mikroorganismy asociovanými s parodontitis, jako jsou *T. denticola*, *F. nucleatum* nebo *TM7. Propionibacterium acnes*, která byla identifikována ve vzorku z aortální chlopně pacienta č. 10 s relativní abundancí téměř 27 %, je anaerobní bakterii typickou spíše pro kůži člověka a zvířat. Ojedinele 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]. 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 ukončení studie pro nedostatek finančních prostředků.

7. Výsledky Experimentální části II

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

Tabulka 1 - 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 ± SD) a hodnota PD byla $5,7 \pm 2,7$ mm (průměr ± SD).

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

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

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

Hodnoty CRP ve skupině pacientů:

A ($2,8 \pm 2,4$ mg/L, průměr ± SE)

B ($2,2 \pm 2,0$ mg/L, průměr ± SE)

C ($2,1 \pm 1,7$ mg/L, průměr ± SE)

D ($1,3 \pm 0,7$ mg/L, průměr ± SE)

Statisticky signifikantní rozdíly byly zjištěny mezi skupinami A a D ($p = 0,01$) a mezi skupinami B a D ($p = 0,02$).

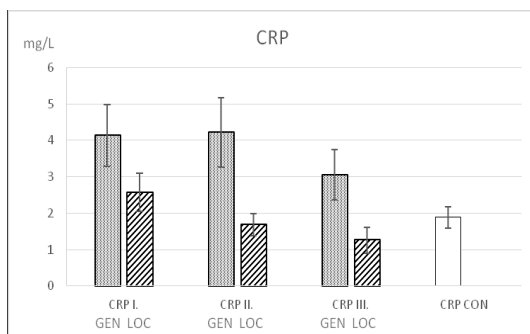
8. Výsledky Experimentální části III

Tabulka 2 - 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 [%]	BOPIII [%]	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		

BOP: bleeding on probing, CAL: clinical attachment loss, CON: kontrolní skupina, CRP: C reaktivní protein, GEN: skupina pacientů s generalizovanou formou agresivní parodontitidy, LOC: skupina pacientů s lokalizovanou formou agresivní parodontitidy, PD: pocket depth, SD: standardní odchylka
Kompletní grafické a tabulkové zpracování všech výsledků je uvedeno v disertační práci.

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



Obrázek 1 – Hodnoty CRP

Hodnoty CRP u skupin pacientů GEN a LOC a kontrolní skupiny CON, které jsou zobrazeny v tabulce 2.

9. Diskuse

Mezi bakteriálními taxony, které byly v naší studii identifikovány ve tkáni srdeční chlopně a jsou též spojovány se zánětlivým onemocněním parodontu patří: *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *P. intermedia*, *Veillonella dispar*, *Alloprevotella tannerae* 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]. *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].

Pokud bychom srovnávali taxonomické bakteriální složení na chlopněm 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 parodontitida 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 *Hemophilus parainfluenzae* a *P. acnes*, i když stav parodontu odpovídal pokročilé chronické parodontitida. U pacientů č. 11 a 12 s pokročilou parodontitida chronica převažují v chlopněm 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.

V 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.

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 projevovalo jakékoli onemocnění KVS. 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 rozdělení 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 použítá antibiotika a další chirurgická terapie ani již dříve zmíněná antibiotika nezvýšila tento efekt [Giannopoulou et al., 2016]. 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 či počet leukocytů, 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.

10. 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. 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. 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. Systémové markery zánětu jsou dalším významným faktorem, který spojuje KVS a parodontitis. 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.

11. Použitá literatura

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Koren, O., Spor, A., Felin, J., Fåk, F., Stombaugh, J., Tremaroli, V., Behre, C.J., 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.

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

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

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.

Shojaee, M., Fereydooni, Golpasha, M., Maliji, G., Bijani, A., Aghajpour, 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.

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.

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

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

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.

Seznam publikací doktoranda

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce:

a/ s impact factorem (uvést hodnotu IF)

Mysak, J., Podzimek, S., Vasakova, J., Mazanek, J., Vinsu, A., Duskova, J.: C reactive protein in patient with aggressive periodontitis. Journal of dental sciences 2017, 12(4), 368-374. **IF 0,7**

Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J.: *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. Journal of immunology research 2014, 476068. **IF 2,934**

Bartova, J., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., **Mysak, J.**, Prochazkova, J., Duskova, J., Janatova, T., Podzimek, S.: Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. Journal of immunology research 2014, 636893. **IF 2,934**

Podzimek, S., **Mysak, J.**, Janatova, T., Duskova, J.: C-Reactive Protein in Peripheral Blood of Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis, Gingivitis, and Gingival Recessions. Mediators of inflammation 2015, 564858. **IF 3,55**

b/ bez IF: -

Publikace *in extenso* bez vztahu k disertační práci:

Jágr, M., Eckhardt, A., Pataridis, S., Foltán, R., **Myšák, J.**, Mikšík, I.: Proteomic analysis of human tooth pulp proteomes – Comparison of caries-resistant and caries-susceptible persons. Journal of proteomics 2016, 145, 127-136. **IF 3,888**