

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Iveta Chrástová**

**Dentální materiály a imunitní reakce**

Dental materials and immune reaction

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Jiřina Bártová, CSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 14. 8. 2013

---

Podpis

Poděkování patří mé školitelce RNDr. Jiřině Bártové, CSc. za odborné a cenné rady při vypracování diplomové práce, za snadné zapojení se do chodu laboratoře a také ostatním členům naší laboratoře, zejména RNDr. Štěpánu Podzimekovi, Ph.D. Také děkuji vedení Ústavu klinické a experimentální stomatologie Prof. MUDr. Janě Duškové, DrSc., MBA za možnost zapojit se zde do vědecké práce a Prof. MUDr. Jarmile Procházkové, CSc. a MUDr. Zoře Venclíkové, CSc. za možnost práce na jejich grantech (IGA MZ ČR NT 13087-3 a IGA MZ ČR NT 12206-4). Poděkování také patří RNDr. Jaromíru Běláčkovi, CSc. za statistické hodnocení naměřených dat.

## Abstrakt

Nežádoucí reakce na kovy je poměrně častá u senzitivních jedinců a může vést k vývoji různých onemocnění, jako například lichen planus a lichenoidní reakce a popsán byl také vliv amalgámu na patologii autoimunitních onemocnění. U senzitivních pacientů s kovovými dentálními materiály může dojít k atrofii sliznice dutiny ústní a pacienti udávají také nepříjemné pocity v dutině ústní (pálení, řezání, nadměrná salivace). Reakce na kovy obsažené v dentálních materiálech je popisována jako alergická reakce IV. typu oddálené přecitlivělosti, dochází k narušení obranyschopnosti organismu, zvýšené cévní permeabilitě, tkáně jsou často poškozeny chronickým zánětem a v místě reakce se aktivuje také antigenně nespecifická složka imunity. Pro reakce oddálené přecitlivělosti je důležitá kooperace buněk prezentujících antigen (makrofágy a dendritické buňky) a T buněk.

Monocyty jsou klíčové buňky imunitního systému, které se jako buňky prezentující antigen, zejména po přeměně v tkáních v makrofágy, přímo podílejí na aktivaci imunitní odpovědi a jejich stimulace je tedy zásadním faktorem při rozvoji nežádoucí reakce na dentální materiály. V diplomové práci byla proto měřena produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi kovů přítomných v dentálních materiálech. Ke zjištění rozsahu imunitní odpovědi pacientů na kovy byl použit test proliferace lymfocytů (MELISA<sup>®</sup>), který byl vyvinut a patentován ve Švédsku. Byla porovnána proliferace lymfocytů po kultivaci se solemi kovů před průměrně 12 lety a nyní u pacientů, u kterých byla před 12 lety zjištěna přecitlivělost na kovy a objevily se u nich nežádoucí účinky, plynoucí z přítomnosti kovů v dutině ústní.

Bylo zjištěno, že po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní dochází u pacientů ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi rtuti, železa, niklu a platiny. Stimulací monocytů solemi kovů byla objevena u pacientů s odstraněnými kovovými dentálními materiály snížená produkce GCSF, GM-CSF, IL-10, IL-11, IL-12 a M-CSF ve srovnání s pacienty s přítomností kovů v dutině ústní. Také bylo prokázáno, že HgCl<sub>2</sub> je schopen vyšší aktivace imunitní odpovědi ve srovnání s NiCl<sub>2</sub>. Kov působí po vazbě na bílkovinu (jako haptén) na organismus zřejmě více směry a dochází k produkci mnoha cytokinů.

**Klíčová slova:** dentální materiály, monocyty, MELISA<sup>®</sup>, soli kovů, HgCl<sub>2</sub>

## Abstract

Adverse reactions to metals is relatively frequent in sensitive individuals, and may lead to the development of various diseases, such as lichen planus and lichenoid reaction and was also described effect of amalgam to the pathology of autoimmune diseases. In sensitive patients with known reactions to metals leads to atrophy of the oral mucosa and discomfort (burning, cutting, excessive salivation).

Adverse effects of dental materials are described as an allergic reaction type IV delayed hypersensitivity. It disrupt the immune system, increased vascular permeability, tissue is often damaged by chronic inflammation and it is also activated antigen-nonspecific component of immunity.

Monocytes are the key cells of the immune system, which act as antigen presenting cells, in particular after conversion in the tissues into macrophages are directly involved in the activation of immune responses and their stimulation is therefore crucial for the development of adverse reactions to dental materials.

In the thesis was measured cytokine production by monocytes after stimulation with metal salts. To determine the extent of the patients' responses to the metals was used lymphocyte proliferation assay (MELISA<sup>®</sup>), which was developed and patented in Sweden. We compared lymphocyte proliferation after stimulation with metal salts 12 years ago and now in patients with hypersensitivity to the metal salts 12 years ago and who had appeared side effects arising from the presence of metals in the oral cavity.

It was found, that after removal of metallic dental materials of the oral cavity, patients had reduced lymphocyte proliferation after stimulation with salts of Hg, Fe, Ni and Pt. After stimulation of monocytes with metal salts was discovered reduced production of GCSF, GM-CSF, IL-10, IL-11, IL-12 a M-CSF. Also it was shown, that HgCl<sub>2</sub> is capable higher activation of the immune response compared with NiCl<sub>2</sub>. Metals work by binding to a protein (as haptens) and had on the body more directions, that leads to the production of many cytokines, whose levels are often influenced.

**Key words:** dental materials, monocytes, MELISA<sup>®</sup>, metal salts, HgCl<sub>2</sub>

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	- 5 -
<b>Abstract</b> .....	- 6 -
<b>Obsah</b> .....	- 7 -
<b>1 Seznam zkratek</b> .....	- 9 -
1.1 Zkratky .....	- 9 -
1.2 Chemické sloučeniny .....	- 11 -
1.3 Chemické značky prvků .....	- 12 -
<b>2 Úvod</b> .....	- 12 -
<b>3 Cíle práce</b> .....	- 13 -
<b>4 Přehled literatury</b> .....	- 14 -
4.1 Imunitní reakce oddálené přecitlivělosti .....	- 14 -
4.1.1 Monocyty .....	- 14 -
4.1.2 Makrofágy .....	- 16 -
4.1.3 Dendritické buňky .....	- 18 -
4.1.4 Bazofily .....	- 18 -
4.1.5 Eozinofily, neutrofilny .....	- 19 -
4.2 Nežádoucí reakce na kovy v dentálních materiálech .....	- 19 -
4.2.1 Rtuť .....	- 22 -
4.2.2 Zinek .....	- 27 -
4.2.3 Stříbro.....	- 27 -
4.2.4 Titan .....	- 28 -
4.2.5 Nikl.....	- 29 -
4.3 Alergická kontaktní dermatitida .....	- 31 -
4.4 Lichen planus .....	- 34 -
<b>5 Experimentální část</b> .....	- 36 -
5.1 Materiál .....	- 36 -
5.1.1 Použité chemikálie .....	- 36 -
5.1.2 Použité přístroje .....	- 37 -
5.1.3 Použité programy .....	- 37 -

5.1.4 Pacienti.....	- 37 -
5.2 Metody.....	- 40 -
5.2.1 Odběr krve.....	- 40 -
5.2.2 Izolace mononukleárních buněk (PBMC) z periferní krve.....	- 40 -
5.2.3 Izolace monocytů z periferní krve a jejich stimulace solemi kovů....	- 40 -
5.2.4 Kultivace PBMC (po odstranění adherentních monocytů) se solemi kovů k průkazu proliferace lymfocytů .....	- 41 -
5.2.5 MELISA <sup>®</sup> (test proliferace lymfocytů) .....	- 43 -
5.2.6 RayBio <sup>®</sup> Human Inflammation Antibody Array 3 .....	- 44 -
5.2.6 Statistické zpracování dat.....	- 46 -
<b>6 Výsledky .....</b>	<b>- 47 -</b>
6.1 Validace metody RayBio <sup>®</sup> .....	- 47 -
6.2 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní po stimulaci PBMC solemi kovů u pacientů po odstranění kovů z dutiny ústní .....	- 49 -
6.3 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi Hg, Ni, Ag nebo TiO <sub>2</sub> a ZrO <sub>2</sub> u pacientů po odstranění kovů v dutiny ústní.....	- 50 -
6.4 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci PBMC solemi kovů u pacientů s reakcí na rtuť.....	- 51 -
6.5 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů HgCl <sub>2</sub> nebo NiCl <sub>2</sub> ..	- 52 -
6.6 Rozdíly v produkci cytokinů monocytů a proliferace lymfocytů u pacientů s ústním dyskomfortem a atrofií sliznice. ....	- 54 -
6.7 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci solemi kovů u pacientů s alergií .....	- 54 -
6.8 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci solemi kovů u pacientů s negativní rodinnou anamnézou.....	- 55 -
6.9 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi Hg, Ni, Ag nebo TiO <sub>2</sub> a ZrO <sub>2</sub> u pacientů s pozitivní/negativní rodinnou anamnézou. -	57 -
6.10 Vzájemný vztah mezi měřenými cytokiny a jejich korelace s kovy .....	- 59 -
<b>7 Diskuze.....</b>	<b>- 61 -</b>
<b>8 Souhrn .....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>9 Seznam použité literatury .....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>- 78 -</b>



# 1 Seznam zkratek

## 1.1 Zkratky

ACD	alergická kontaktní dermatitida (allergic contact dermatitis)
APC	buňky prezentující antigen
BDCA-2	antigen dendritických buněk v krvi 2 (blood dendritic cell antigen 2)
CCL	chemokinový ligand
CCR	chemokinový receptor
CD	diferenciační antigen (cluster of differentiation)
CD40L	ligand molekuly CD40
CD62L	ligand molekuly CD62
CR	komplementový receptor
CXCL	chemokin C-X-C (C-X-C motif chemokine)
CXCR	receptor chemokinů C-X-C (C-X-C chemokine receptor type)
Cys	cystein
DC	dendritické buňky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
Flt3-L	(Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)
FOXP3	transkripční faktor T regulačních lymfocytů (forkhead box P3)
G-CSF	růstový faktor granulocytů
GM-CSF	růstový faktor granulocytů a makrofágů
GPCR	receptor spojený s G-proteiny (G protein-coupled receptor)
GSH	glutathion
HBD-2	lidský beta defensin 2 (human beta defensin-2)
HEMA	hydroxyethylmetakrylát
HIF-1 $\alpha$	(hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
HMVEC	lidské endoteliální buňky (human microvascular endothelial cells)
HSA	lidský sérový albumin (human serum albumin)
I-309 (CCL1)	chemokinový ligand s motivem C-C
ICAM-1	vnitrobuněčná adhezivní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
IFN	interferon
IKK2	(inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta)
IL	interleukin

IL-3R	receptor pro IL-3
IL-6sR	solubilní receptor pro IL-6
IP-10	protein indukovaný IFN- $\gamma$ (interferon gamma-induced protein 10)
KU-812	bazofilní buněčná linie
LC	Langerhansovy buňky
LPS	lipopolysacharid
MCP	chemoatraktant pro monocyty (monocyte chemoattractant protein)
M-CSF	růstový faktor makrofágů (monocytů)
MDC	chemokin produkovaný makrofágy (macrophage-derived chemokine)
MELISA	test proliferace lymfocytů (memory lymphocyte immuno-stimulation assay)
MIG	chemoatraktant produkovaný vlivem IFN- $\gamma$ (monokine induced by gamma interferon)
miRNA (miR)	malé molekuly ribonukleové kyseliny
MIP	chemokin produkovaný makrofágy při zánětu (macrophage inflammatory protein)
mRNA	messengerová (informační, mediátorová) ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Neg	negativní kontrola
NF- $\kappa$ B	jaderný transkripční faktor kappa B (nuclear transcription factor kappa B)
NK buňky	přirození zabíječi (natural killer)
NKG2D	receptor NK buněk
OLP	orální lichen planus
OLR	orální lichenoidní reakce
PBMC	mononukleární buňky v periferní krvi (peripheral blood mononuclear cells)
PCG	sklo s nanosenou vrstvou plazmy (plasma-coated glass)
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PDGF	růstový faktor produkovaný krevními destičkami
PGD <sub>2</sub>	prostaglandin D <sub>2</sub>
Pos	pozitivní kontrola
PRR	receptor rozpoznávající struktury patogenů (pattern recognition receptor)
PWM	Pokeweed mitogen
RA	rodinná anamnéza
RANTES	chemokin (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)
rIL-10	rekombinantní interleukin 10
SSB	protein, který se váže na ssDNA (single strand binding protein)
sTNF R	solubilní receptor pro TNF

TARC	chemokín produkovaný v thymu a po aktivaci buněk (thymus and activation regulated chemokine)
Tc	cytotoxické T lymfocyty
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor beta)
Th	pomocné T lymfocyty
Thio	thiomersal
TIMP	inhibitor metaloproteináz ve tkáních
TLR	receptory skupiny Toll (Toll-like receptor)
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
Tr1	regulační T buňky 1 (T regulatory cells 1)
Tregs	T regulační lymfocyty
TSLP	cytokín produkovaný stromálními buňkami thymu (Thymic stromal lymphopoietin)
VCAM-1	adhezivní molekula endoteliálních buněk (vascular cell adhesion molekule 1)
VEGF	růstový faktor endoteliálních buněk (vascular endothelial growth factor)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZR	zásobní roztok

## 1.2 Chemické sloučeniny

Ag <sub>2</sub> S	sulfid stříbrný
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	síran hlinitý
AlCl <sub>3</sub>	chlorid hlinitý
CdCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	dihydrát chloridu kademnatého
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	hexahydrát chloridu kobaltnatého
CrCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	hexahydrát chloridu chromitého
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	pentahydrát síranu měďnatého
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	oxid železitý
HgCl <sub>2</sub>	chlorid rtuťnatý
CH <sub>3</sub> COOAg	octan stříbrný
CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> , CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> Hg <sup>+</sup>	kation methylrtuti, ethylrtuti
MoO <sub>3</sub>	oxid molybdenový
Na <sub>3</sub> Au(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	dihydrát dithiosíranu sodno-zlatného
NH <sub>4</sub> PtCl <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	dihydrát tetrachloroplatitanu amonného
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	hexahydrát chloridu nikelnatého
NO	oxid dusnatý
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	dusičnan olovnatý

$\text{PdCl}_2$	chlorid palladnatý
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu cínatého
$\text{TiCl}_3$	chlorid titaničný
$\text{TiO}_2$	oxid titaničný
$\text{ZnO}$	oxid zinečnatý
$\text{ZnSO}_4$	síran zinečnatý
$\text{ZrO}_2$	oxid zirkoničný

### 1.3 Chemické značky prvků

Ag	stříbro
Al	hliník
Au	zlato
C	uhlík
Cd	kadmium
Ce	cer
Cl	chlor
Co	kobalt
Cr	chrom
Cu	měď
Fe	železo
H	vodík
Hg	rtuť
Mn	mangan
Mo	molybden
N	dusík
Na	sodík
Nb	niob
Ni	nikl
O	kyslík
Pb	olovo
Pd	palladium
Pt	platina
S	síra
Si	křemík
Sn	cín
Ti	titan

W

Zn

Zr

vanad

zinek

zirkonium

## 2 Úvod

V současné medicíně se uplatňuje stále se zvyšující počet materiálů. Biomateriály interagují s biologickým systémem a vyznačují se schopností vyvolat odpovídající imunitní odpověď organismu. Důležitou vlastností je biokompatibilita, míra snášenlivosti materiálu v biologickém systému. Ta je u materiálů obsahujících kovy ovlivňována zejména uvolňováním kovových iontů z jejich povrchu vlivem rozpustnosti a korozivními vlastnostmi. Nežádoucí reakce na kovy je u senzitivních jedinců poměrně častá a může docházet k vývoji různých onemocnění, jako například lichen planus a lichenoidní reakce a popsán byl také vliv amalgámu na patologii autoimunitních onemocnění. U senzitivních pacientů s kovovými dentálními materiály může dojít též k atrofii sliznice dutiny ústní a pacienti udávají nepříjemné pocity v dutině ústní (pálení, řezání, nadměrná salivace).

Nežádoucí účinky dentálních materiálů jsou popisovány jako reakce IV. typu oddálené přecitlivělosti. Dochází k narušení obranyschopnosti organismu, ke zvýšení cévní permeability, v místě reakce je aktivována také antigenně nespecifická složka imunity a tkáně jsou často poškozeny chronickým zánětem. Zejména po působení niklu může docházet k projevu alergické kontaktní dermatitidy, která je popisována jako reakce oddálené přecitlivělosti s možnou úlohou přirozených zabíječů (NK buněk), které reagují na přítomnost niklu (jako haptenu) produkcí interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), jehož vysoká hladina je typická pro reakci oddálené přecitlivělosti. Aby docházelo k produkci IFN- $\gamma$  T a NK buňkami, je důležitý jejich kontakt s buňkami prezentujícími antigen, které po aktivaci produkují IL-12. Interleukin IL-12 stimuluje T a NK buňky k produkci IFN- $\gamma$ .

Vzhledem k těmto skutečnostem jsme v této pilotní studii sledovali produkci cytokinů po stimulaci monocytů (adherentních buněk) solemi kovů. Monocyty jsou klíčové buňky imunitního systému, které se jako buňky prezentující antigen, zejména po přeměně v tkáních v makrofágy, přímo podílejí na aktivaci imunitní odpovědi a jejich stimulace je tedy zásadním faktorem pro rozvoj nežádoucí reakce na kovové dentální materiály.

Ke zjištění rozsahu reakce pacientů na kovy byl použit test proliferace lymfocytů (MELISA<sup>®</sup>), který byl vyvinut a patentován ve Švédsku. Byla porovnána proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů, přítomných v dentálních materiálech, před průměrně 12 lety a nyní u pacientů, u kterých byla před 12 lety zjištěna přecitlivělost na kovy.

### 3 Cíle práce

Pacienti byli rozděleni do skupin podle toho, na který kov před 12 lety vykazovali nejvyšší hladinu proliferace lymfocytů (vyjádřené stimulačním indexem), podle přítomnosti kovů v dutině ústní, výskytu alergie, onemocnění a rodinné anamnézy.

Cíle diplomové práce byly následující:

- 1) Porovnat úroveň proliferace lymfocytů po stimulaci kovy, přítomnými v dentálních materiálech, před průměrně 12 lety a nyní u pacientů, u kterých byla před 12 lety zjištěna přecitlivělost na kovy (zejména nikl nebo rtuť) a objevily se u nich nežádoucí účinky, plynoucí z přítomnosti kovů v dutině ústní. Změny v proliferaci lymfocytů analyzovat u všech pěti skupin pacientů.
- 2) Určit změny v produkci cytokinů po kultivaci monocytů (adherentních buněk) se solemi kovů, které jsou složkami dentálních materiálů, a toto porovnání provést u všech pěti skupin pacientů.

## 4 Přehled literatury

### 4.1 Imunitní reakce oddálené přecitlivělosti

Imunitní reakce typu oddálené přecitlivělosti je důležitým nástrojem buněčné imunity. K aktivaci dochází po imunizaci nebo infekci nejen intracelulárními parazity a je zprostředkována antigenně specifickými T buňkami. Dochází k produkci cytokinů, zvýšené cévní permeabilitě a v místě reakce se aktivuje také antigenně nespecifická složka imunity. Imunitní reakce je plně dosažena po 48 hodinách a její hladina je udržena několik dní (Alexander and Curtis, 1979). Typická je vysoká produkce IFN- $\gamma$  (interferon gamma) (Schnorr et al., 2012).

Imunitní odpověď typu Th1/Th2 (pomocné T lymfocyty) může být regulována pomocí mikroRNA miR-21. Jejím odstraněním bylo pozorováno zvýšení produkce IFN- $\gamma$ , a tedy aktivace imunitní odpovědi ve směru Th1. Vazebným místem miR-21 je podjednotka interleukinu IL-12p35. Při ztrátě miR-21 produkují dendritické buňky (DC) po stimulaci lipopolysacharidem (LPS) vyšší množství IL-12 (Lu *et al.*, 2011).

Interleukin IL-12 je produkován buňkami prezentující antigen (APC), a tedy monocyty, makrofágy, dendritickými buňkami a B buňkami. Strukturou je to heterodimer ze dvou kovalentně spojených podjednotek p40 a p35 a je silným aktivátorem T a NK buněk, které působením IL-12 produkují IFN- $\gamma$  (přehledně v Trinchieri, 1994).

#### 4.1.1 Monocyty

Monocyty mohou být izolovány z periferní krve gradientovou centrifugací na Ficollu a po adhezenci v kultivačních lahvích. Pozitivní selekce je často zprostředkována protilátkami proti molekule CD14, přítomné na monocyttech (Zhou *et al.*, 2012). Lidské mononukleární buňky jsou izolovány z periferní krve (PBMC) a po kultivaci s endoteliálními buňkami je část buněk schopna adherence na endotel za vzniku populace krevních monocytů CD11b<sup>+</sup>. Po 24 až 72 hodinách je dosaženo syntézy oxidu dusnatého (NO), CD105, CD144 a VEGF-receptor2 (receptor pro růstový faktor endoteliálních buněk). Až 10 % PBMC vykazovalo adhezenci na endotel a z nich odvozené monocyty dosahovaly 30 % adherentních buněk. Bylo objeveno, že působením TNF- $\alpha$  (faktor nekrotizující nádory) docházelo k tvorbě důležité adhezivní molekuly endoteliálních buněk VCAM-1 (Tso *et al.*, 2012). Po kultivaci endoteliálních buněk s TNF- $\alpha$  byla zvýšena



exprese proteinu MCIP-1 (Monocyte chemoattractant induced protein-1). Tento protein byl nalezen v monocytech v periferní krvi, které byly vystaveny účinku MCP-1 (CCL2, chemoatraktant pro monocyty). Zvýšením exprese MCIP-1 bylo pozorováno potlačení aktivace endotelu po působení TNF- $\alpha$ , což bylo detekováno sníženou produkcí VCAM-1 a tím i redukcí adherence monocytů k endoteliálním buňkám. Protein MCIP-1 se zdá být důležitým faktorem v regulaci prozánětlivé aktivace endotelu (Qi *et al.*, 2010). Chemotaktický faktor pro monocyty MCP-1 má významnou roli v iniciaci a progresi růstu nádoru. Produkován může být nádorovými i jinými buňkami a bylo prokázáno, že je schopen aktivovat růst metastáz rakovinných buněk prsu (Yoshimura *et al.*, 2013). Dalším důležitým chemokinem je MDC (macrophage-derived chemokin), produkovaný makrofágy nebo dendritickými buňkami. Jeho chemotaktická aktivita působí na monocyty, dendritické buňky odvozené z monocytů nebo na NK buňky, které byly aktivovány působením IL-2 (Godiska *et al.*, 1997).

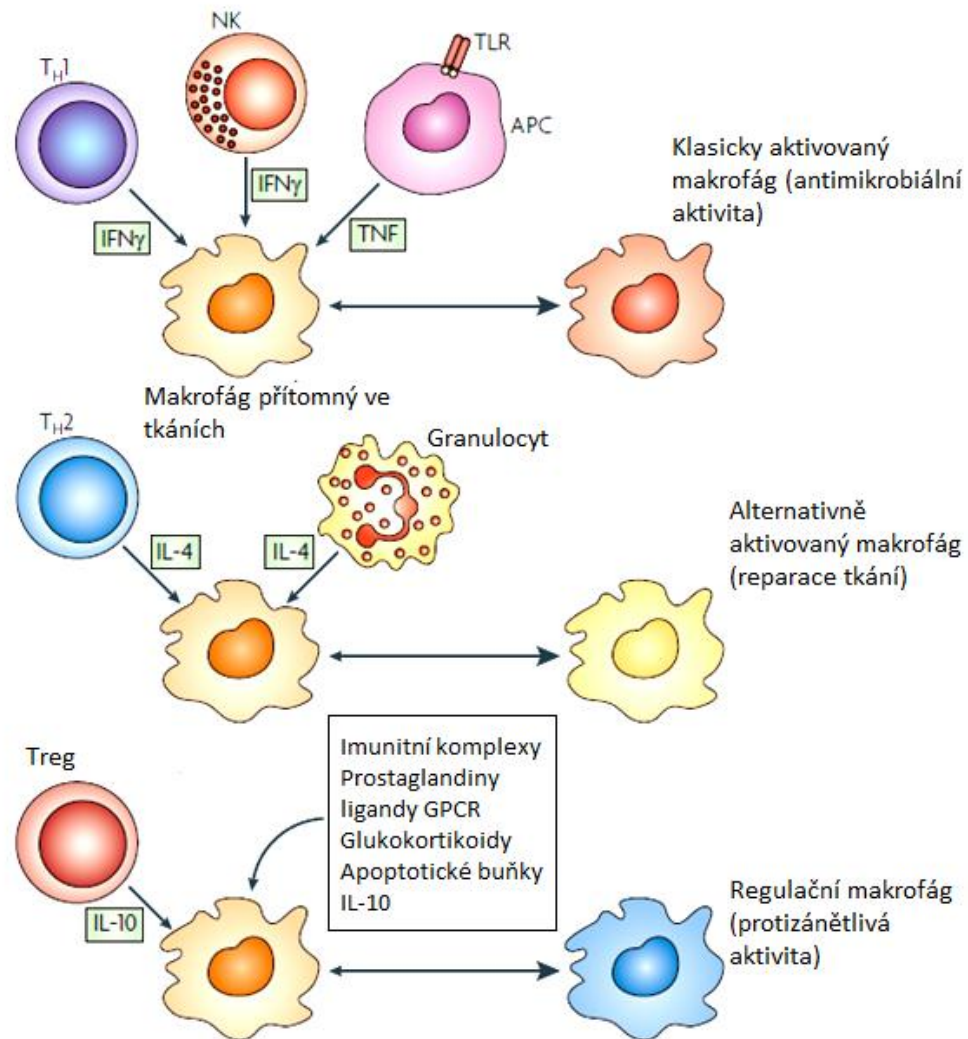
Byl studován vliv interleukinu IL-10 na adherenci (přilnavost) monocytů, které byly izolovány z periferní krve. U adherentních monocytů bylo pozorováno snížení exprese CD11b po působení IL-10, zatímco hladina toll-like receptorů TLR2 a TLR4 byla zvýšena. Pokud buňky ztratily přilnavost k povrchům (nebo jiným buňkám) a byly vystaveny působení IL-10, bylo pozorováno zvýšení produkce IL-1 $\beta$  a solubilního receptoru II pro TNF v buňkách (sTNF R). Také je dosaženo stimulace fagocytózy (Petit-Bertron *et al.*, 2003).

Interleukin IL-1 $\beta$  je důležitým zánětlivým faktorem, uplatňujícím se v akutních infekcích a zranění. Adherence monocytů je významným signálem k produkci stabilní IL-1 $\beta$  mRNA, ale k translaci je nutný i druhý signál zprostředkovaný lipopolysacharidem (LPS). Regulace produkce interleukinu IL-1 $\beta$  je spojena s funkcí a skládáním cytoskeletu. Na rozdíl od pohyblivých buněk, IL-1 $\beta$  mRNA nebyla u adherentních monocytů nalezena v distální nebo proximální části aktinového cytoskeletu. Největší podíl IL-1 $\beta$  mRNA byl asociován s intermediárními filamenty (Böcker *et al.*, 2001).

### 4.1.2 Makrofágy

Makrofágy jsou zahrnovány mezi profesionální fagocyty. Rozpoznávají cizorodé struktury a nekrotické buňky prostřednictvím toll-like receptorů na povrchu a dalších receptorů, rozpoznávajících struktury patogenů (PRR, pattern recognition receptor). Vyuvíjejí se z monocytů, jejichž tvorba začíná v kostní dřeni, poté cirkulují krevním řečištěm do periferních tkání, kde se mění na makrofágy. Do této populace buněk jsou zahrnuty osteoklasty, mikrogliové buňky, Kupfferovy buňky, histiocyty (přehledně v Mosser and Edwards, 2008). Na **Obr. 1** (str. 18) jsou znázorněny různé způsoby aktivace makrofágů.

Na makrofágové tkáňové linii THP1 (monocyto-makrofágová linie lidského původu) byla testována imunitní odpověď po stimulaci těchto buněk solemi kovů, které se vyskytují v dentálních materiálech. Metodou RayBio<sup>®</sup> Human Inflammation Antibody Array 3 byla měřena produkce cytokinů a tato hladina byla porovnávána s reakcí nestimulovaných buněk. Bylo zjištěno, že ionty titanu podporovaly tvorbu MCP-1 a MCP-2 a inhibována byla produkce IL-6sR a IL-12p70. Po kultivaci se solí rtuti byla signifikantně zvýšena hladina MCP-2 a sTNF-RI a snížena u IL-12p70, IL-1 $\alpha$  a ICAM-1 (vnitrobuněčná adhezivní molekula). Ionty chromu zvyšovaly produkci chemokinu RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted), sTNF RI a IL-8, snížení hladiny bylo pozorováno u M-CSF (faktor stimulující kolonie makrofágů), IL-6sR a IL-1 $\alpha$ . Stimulací buněk solí kobaltu bylo dosaženo signifikantnímu zvýšení produkce TNF- $\beta$  a sTNF RI, potlačena byla tvorba M-CSF, IL-12p70, IL-1 $\alpha$  a ICAM-1. Po kultivaci se solí niklu byla pozorována zvýšená produkce IL-6 buňkami makrofágové linie THP1 a signifikantně snížena byla hladina M-CSF, IL-6sRm IL-12p70 a IL-1 $\alpha$ . Významná byla i produkce cytokinů buňkami THP1 po kultivaci se solí palladia. Bylo pozorováno zvýšení tvorby TGF- $\beta$  (transformující růstový faktor) a sTNF RI a snížena byla produkce IL-6sR a IL-1 $\alpha$ . Také byla objevena zvýšená produkce IL-10 po stimulaci buněk titanem, chromem a niklem (Venclíková *et al.*, 2013).



Obr. 1 **Různé způsoby aktivace makrofágů.** Klasickou cestou je makrofág aktivován prostřednictvím IFN- $\gamma$ , který je produkován buňkami Th1, CD8+ T buňkami nebo NK buňkami (buňky vrozené imunity). K aktivaci může docházet také působení TNF, který je uvolňován z aktivovaných buněk prezentujících antigen. Klasicky aktivované makrofágy mají zejména antimikrobiální aktivitu. Alternativní cesta aktivace zahrnuje IL-4, který může být produkován Th2 buňkami nebo granulocyty. Alternativně aktivované makrofágy se uplatňují v reparaci tkání. Regulační makrofágy vznikají působením různých antigenů, například imunitních komplexů, prostaglandinů, ligandů receptorů spojených s G-proteiny (ligandy GPCR), glukokortikoidů, apoptotických buněk nebo interleukinu IL-10. Jejich hlavní úlohou je potlačení imunitní odpovědi prostřednictvím IL-10, který produkují ve vysokém množství (převzato a upraveno z Mosser and Edwards, 2008).

### 4.1.3 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) patří mezi účinné buňky prezentující antigen a jsou důležitou komponentou imunitního systému. Kooperují s T buňkami prostřednictvím svých specifických receptorů a dalších adhezivních molekul. Rozlišujeme dvě populace DC, myeloidní a plazmacytoidní. Myeloidní DC se vyznačují povrchovými markery CD123<sup>-</sup> (IL-3R $\alpha$ )/ CD11c<sup>+</sup> (CR4, komplementový receptor) (Ayehunie *et al.*, 2009). Vyvíjejí se z CD34<sup>+</sup> hematopoetických progenitorových buněk působením GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů) a TNF- $\alpha$  nebo z monocytů v přítomnosti cytokinů GM-CSF a IL-4. Pod vlivem CD40L dozrávají a začínají produkovat interleukin IL-12, který je důležitým aktivátorem Th1 buněčné linie. Pro rozpoznání cizorodých struktur mají na povrchu toll-like receptory TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 a TLR8 (Jarrossay *et al.*, 2001).

Plazmacytoidní DC se diferencují z CD34<sup>+</sup> hematopoetických buněk pod vlivem Flt3-L (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand) (Chen *et al.*, 2004) a dalšími růstovými faktory jsou CD40L a IL-3. Vazbou antigenu na receptory dochází k aktivaci a produkci Th2 typu cytokinů, IL-4 a IL-10 (Rissoan *et al.*, 1999). Mezi povrchové markery patří CD123<sup>+</sup> (IL-3R $\alpha$ )/ CD11c<sup>-</sup> (CR4) (Ayehunie *et al.*, 2009). Dále se vyznačují produkcí IFN  $\alpha/\beta$  v odpovědi na viry a jsou tedy důležité k udržení antivirového stavu. Rozpoznání virů probíhá prostřednictvím receptorů TLR7 a TLR9 (Jarrossay *et al.*, 2001).

### 4.1.4 Bazofily

Bazofily jsou buňky imunitního systému, které se uplatňují zejména během alergické reakce. Produkcí zánětlivých mediátorů by se tyto buňky mohly podílet na rozvoji přecitlivělosti na kovy v dentálních materiálech. Jejich vlastností je schopnost adherence k vaskulárnímu endotelu. Studie prokázala, že cytokiny IL-8 a RANTES podporovaly adherenci bazofilní buněčné linie KU-812 k endotelu. Docházelo k aktivaci migrace bazofilů jen po předchozí stimulaci IL-5 nebo PMA (phorbol myristate acetate). Interleukin IL-8 byl přitom silnějším aktivátorem migrace a adheze k endotelu ve srovnání s RANTES. Naproti tomu adheze byla utlumena působením protilátek anti-CD18, anti-CD11c nebo protilátkami proti  $\beta_1$ -integrinům. Adheze lidských bazofilů byla ovlivňována pouze protilátkami proti  $\beta_2$ -integrinům (BACON *et al.*, 1994).

#### 4.1.5 Eozinofily, neutrofilny

Úloha při rozvoji přecitlivělosti na kovy v dentálních materiálech by mohla být přisouzena i eozinofilům a neutrofilům. Ve tkáni během alergické reakce je dosaženo akumulace eozinofilů, a proto byla studována adherence lidských eozinofilů a neutrofilů na sklo s nanesenou vrstvou plazmy (PCG, plasma-coated glass) a na lidské endoteliální buňky (HMVEC, human microvascular endothelial cells). Bylo objeveno, že IL-5, IL-3 a GM-CSF podporují adherenci eozinofilů. U neutrofilů IL-5 nevykazoval žádný účinek, ve srovnání s ostatními sledovanými cytokiny. Důležitou úlohu při adherenci těchto buněk mají leukocytární integriny CD11/18 (WALSH et al., 1990).

#### 4.2 Nežádoucí reakce na kovy v dentálních materiálech

V současné medicíně se uplatňuje stále se rozvíjející a navyšující počet materiálů, a to včetně stomatologie. Biomateriály se vyznačují interakcí s biologickým systémem (živým organismem) a schopností vyvolat odpovídající imunitní odpověď organismu. Důležitou vlastností je biokompatibilita, míra snášenlivosti materiálu v biologickém systému, která je ovlivňována zejména uvolňováním kovových iontů z povrchu materiálu vlivem rozpustnosti materiálu a korozivními vlastnostmi (Williams, 1987).

Rozlišujeme také materiály bioaktivní, které ovlivňují metabolismus a funkci okolních buněk. Využívá se potahování povrchu biomateriálu za účelem dosažení lepší snášenlivosti organismu (Albrektsson and Johansson, 2001).

Nežádoucí účinky dentálních materiálů jsou popisovány jako vznik alergické reakce IV. typu oddálené přecitlivělosti, ale také je pozorován i jejich obecný negativní vliv na imunitní systém nebo ovlivnění psychického zdraví osob. Dochází k narušení obranyschopnosti organismu a často také k poškození tkáni chronickým zánětem (přehledně ve Forte *et al.*, 2008; Rahilly and Price, 2003).

Pro kostní, ale také i dentální použití je vhodným materiálem titan, který se vyznačuje vynikající biokompatibilitou. Tvorbou stabilní pasivační vrstvy na jeho povrchu je rovněž vysoce korozivně odolný (Smith *et al.*, 1997; přehledně v Sykaras *et al.*, 2000; Frisken *et al.*, 2002; Akagawa and Abe, 2003). Abrází ale může docházet k narušení pasivační vrstvy a reakci uvolněných sloučenin kovů s buněčnými strukturami organismu (přehledně v Jacobs *et al.*, 1998). Korozí materiálu jsou uvolňovány kovové ionty, které mohou způsobovat lokální zánětlivou reakci a poškozovat strukturu kostí (Evans *et al.*, 1974; Merrit *et al.*, 1996; Lalor *et al.*, 1991; Morais *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1998;

Fernandes *et al.*, 1999), což může vést až ke ztrátě implantovaného materiálu (Lalor *et al.*, 1991; Jacobs *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1999). Titan byl objeven v dentinových kanálcích zubů ošetřených kovovými dentálními materiály (Venclíková *et al.*, 2007).

U citlivých jedinců mohou korozivní produkty kovů vyvolat chronický zánět. Dochází k vazbě haptenu (kov navázaný na bílkovinu) na receptory paměťových T buněk, které byly aktivovány specifickým antigenem v minulosti. Po novém setkání těchto buněk s antigenem dochází k jejich aktivaci, produkci cytokinů a vývoji zánětu s projevy na různých místech lidského těla, kde jsou depozita kovů (Šterzl *et al.*, 1999a,b).

Významná je také genetická predispozice při intoleranci kovů. U pacientů s přecitlivělostí na kovy byla objevena zvýšená frekvence HLA-B37 (HLA, lidský leukocytární antigen), HLA-B47 a HLA-DR4 a naopak v menší míře byl zastoupen HLA-DR7 (Saito *et al.*, 1996; Procházková *et al.*, 2000).

Odhojování dentálních implantátů bylo ve vyšší míře potvrzeno u kuřáků (Lemmerman and Lemmerman, 2005). Negativní roli má snížení prokrvení a rovněž i inhalace těžkých kovů (nikl, kadmium) obsažených v cigaretovém kouři společně s nikotinem, dehtem, oxidem uhelnatým a dalšími sloučeninami (Nada *et al.*, 1999).

Titan je využíván ve stomatologii, zejména ve formě oxidu titaničitého TiO<sub>2</sub>, také jako složka zubních past a jako pigment v dentálních materiálech (Dupre *et al.*, 1985). V tkáních, lymfatických uzlinách a plicích dochází jeho zavedením do lékařské praxe ke zvyšování koncentrace titanových iontů (Parr *et al.*, 1985; Abdallah *et al.*, 1994; Torgersen *et al.*, 1995a, 1995b; Haug *et al.*, 1996; Matthew and Frame 1998b). Částice titanu byly nalezeny v lysozomech makrofágů (Mitchell *et al.*, 1990; Lalor *et al.*, 1991; Revell and Lalor 1995; Katou *et al.*, 1996; Matthew and Frame 1998; Frisken *et al.*, 2002).

U pacientů s přecitlivělostí na dentální materiály se objevují subjektivní příznaky: ústní dyskomfort, který zahrnuje pachuť v ústech, vazké sliny, nadměrnou salivaci, pálení a řezání na sliznicích. Může docházet k chronické únavě, kožním reakcím, bolestem hlavy, nadměrnému pocení, zvracení a případně až k poruchám dechu a srdečního rytmu (Procházková *et al.*, 2004a,b,c). Popsán byl rovněž rozvoj autoimunitních onemocnění (Šterzl *et al.*, 1999a,b; Bártová *et al.*, 2003; Procházková *et al.*, 2004a,b).

Bylo zjištěno *in vitro* studií, že kovy nikl Ni (NiSO<sub>4</sub>, 5 %), kobalt Co (CoCl<sub>2</sub>, 1 %), chrom Cr (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 0,5 %), palladium Pd (PdCl<sub>2</sub>, 1 %) a zlato Au (Na<sub>3</sub>[Au(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; 0,5 %) aktivují Th1 i Th2 imunitní odpověď. Kultivací solí jednotlivých kovů s PBMC a následnou detekcí cytokinů (IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-13) byla objevena signifikantně vyšší hladina IL-2 a IL-13 u chromu, IL-2 a IL-4 u palladia, IL-13 a IFN-γ u zlata a imunitní

odpověď na nikl byla zprostředkována všemi čtyřmi testovanými cytokiny (Minang *et al.*, 2006a).

Mechanickým opotřebením nebo korozí se mohou do organismu uvolňovat částice implantátu. Byl studován vliv uvolněných částic z implantátu s obsahem slitiny Co-Cr-Mo na osteocyty. Bylo dosaženo aktivace zánětlivé imunitní odpovědi, která byla zprostředkována TNF- $\alpha$ . Hladina interleukinu IL-6 byla po 6 hodinách stimulace snížena (Kanaji *et al.*, 2009).

Přehled složení vybraných dentálních slitin je shrnut v následující tabulce **Tab. 1**.

Tab. 1 Složení vybraných dentálních slitin na trhu.

	Oranium <sup>1</sup>	Oranium® Ceramic <sup>2</sup>	Koldan <sup>3</sup>	Heranium TH <sup>4</sup>	Wiron® 99 <sup>5</sup>	Aurosa® <sup>6</sup>
Ag [hm. %]	-	-	89,9	-	-	44,8
Au [hm. %]	-	-	-	-	-	20,0
C [hm. %]	< 1,0	-	-	0,15	max. 0,02	-
Ce [hm. %]	-	-	-	-	0,5	-
Co [hm. %]	63,5	61,0	-	63,5	-	-
Cr [hm. %]	28,5	26,0	-	28,0	22,5	-
Cu [hm. %]	-	-	-	-	-	14,4
Fe [hm. %]	< 1,0	< 1,0	-	-	0,5	-
Mn [hm. %]	< 1,0	< 1,0	-	0,6	-	-
Mo [hm. %]	5,8	6,0	-	6,5	9,5	-
N [hm. %]	-	-	-	0,25	-	-
Nb [hm. %]	-	-	-	-	1,0	-
Ni [hm. %]	-	-	-	-	65,0	-
Pd [hm. %]	-	-	-	-	-	20,0
Si [hm. %]	< 1,0	1,2	-	1,0	1,0	-
Sn [hm. %]	-	-	9,3	-	-	-
W [hm. %]	-	5,0	-	-	-	-
Zn [hm. %]	-	-	< 1,0	-	-	< 1,0

<sup>1</sup> Převzato z <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/oraniumtechnickulist.pdf>

<sup>2</sup> Převzato z <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/oraniumceramictechnickulist.pdf>

<sup>3</sup> Převzato z <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/koldantechnickulist.pdf>

<sup>4</sup> Převzato z [http://heraeus-dental.se/media/webmedia\\_local/media/hera/66034837\\_Legierungstabelle\\_GB.pdf](http://heraeus-dental.se/media/webmedia_local/media/hera/66034837_Legierungstabelle_GB.pdf)

<sup>5</sup> Převzato z [http://begousa.com/media/Wiron99\\_brochure.pdf](http://begousa.com/media/Wiron99_brochure.pdf)

<sup>6</sup> Převzato z <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/produkty/soubory/aurosatechnickulist.pdf>

**Oralium® Ceramic** je dentální kobaltová slitina bez obsahu niklu a berylia pro kovokeramické práce, s velmi vysokou pevností (typu 4), velmi dobrou korozní odolností a biokompatibilitou. Ze slitiny lze zhotovovat korunky, můstky malého i velkého rozsahu<sup>2</sup>. **Oralium** je kobaltová dentální slitina na odlitky, bez obsahu niklu a berylia, s velmi vysokou pevností (typu 5). Používá se na konstrukce snímatelných náhrad. Vyznačuje se velmi dobrou korozní odolností a biokompatibilitou<sup>1</sup>. **Koldan** je stříbrná dentální slitina na odlitky s nízkou pevností (typu 0), která je určena pro jednoduché kořenové inlaye (při zhotovování korunkových nástaveb z nekovového materiálu). Při použití slitiny na nástavbu korunky může docházet ke korozi této slitiny. Korozní produkty slitiny mohou u některých lidí vyvolat vedlejší nežádoucí účinky a neodstranitelná pigmentová zbarvení dásně<sup>3</sup>. **Aurosa®** je dentální slitina (Ag-Pd) se sníženým obsahem zlata. Vyznačuje se dobrou zpracovatelností, korozní odolností a velmi vysokou pevností. Použití nachází pro odlitky zubních náhrad vystavené velmi vysokému namáhání (korunky, můstky, spony, třmeny apod.)<sup>6</sup>.

V chronických zánětlivých procesech se zdá mít důležitou roli vitamín B, biotin. Byla porovnána produkce cytokinu IL-1 $\beta$  makrofágovou buněčnou linií v přítomnosti biotinu. Výsledkem byla inhibice produkce IL-1 $\beta$  *in vitro*. Také bylo objeveno, že slezinné buňky myši s potravou neobsahující biotin produkují zvýšené množství IL-1 $\beta$  (Kuroishi *et al.*, 2009).

#### 4.2.1 Rtuť

Účinkům rtuti jsme vystaveni zejména v důsledku používání amalgámových dentálních výplní. Anorganickou rtuť (Hg<sup>2+</sup>) nalezneme také v potravinách a významným zdrojem intoxikací je i organická rtuť (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Hg<sup>+</sup>), kterou přijímáme především v rybách a dalších mořských živočiších nebo aplikací vakcín (thiomersal) (přehledně v Clarkson *et al.*, 2003). Organická i anorganická rtuť byly prokázány v krvi i mozku (Björkman *et al.*, 2007).

#### Dentální amalgám

Rtuť se za normální pokojové teploty nachází v kapalně fázi (přehledně v Uçar and Brantley, 2011). V dentální medicíně je amalgám hojně využívaným materiálem. Používaná slitina obsahuje asi 50 % rtuti ve směsi se stříbrem, cínem a mědí (složení viz **Tab. 2**). Stále více se zvyšuje ohlas na toxické účinky rtuti na pacienty i zdravotnický



personál. Byl zjištěn vliv amalgámových výplní u těhotných žen na vývoj autismu u narozených dětí. Zvýšené riziko bylo prokázáno u žen s více než 6 amalgámovými výplněmi, jejichž děti měly 3,2krát vyšší riziko k diagnóze autismu, lehké (méně než 5 amalgámů) nebo těžší formy onemocnění (Geier *et al.*, 2009).

Bezpečnost tohoto dentálního materiálu je hojně diskutována, zejména vzhledem k uvolňování elementární rtuti ve formě par z amalgámových výplní v dutině ústní. Sledována byla změna koncentrace rtuti v organismu. Po vyjmutí amalgámů z dutiny ústní byla pozorována snížená koncentrace rtuti v moči (Olstad *et al.*, 1987). Rtuť je uvolňována z amalgámových výplní převážně ve formě par a byla prokázána v dutině ústní (Vimy and Lorscheider, 1985ab). Data z provedených studií potvrzují, že v dutině ústní dochází ke kontinuálnímu uvolňování rtuti z amalgámových výplní. Doba uvolňování je ovlivňována mnoha faktory, jako například plochou povrchu výplně, věkem osoby a také příjmem potravy, složením amalgámu a silou povrchové vrstvy oxidu. Páry rtuti se rozpouštějí do vzduchu nebo slin v dutině ústní (přehledně v Uçar and Brantley, 2011). Vzhledem k účinkům rtuti na organismus Evropská komise v současné době uvažuje o zákazu použití dentálního amalgámu v roce 2018.

Rtuť může ovlivnit organismus mnoha cestami:

- Inhalací par elementární rtuti, uvolněných v dutině ústní z amalgámových výplní.
- Mechanickým opotřebením dentálního amalgámu a uvolněním malých částic, které mohou také vznikat při umístění nebo výměně výplně a tyto částice mohou být následně polknuty.
- Korozními produkty anorganické i elementární rtuti, které se polknutím dostávají do organismu.
- Může být vytvořena „tetováž“, kdy jsou částice amalgámu (zejména stříbra) zakotveny v přilehlé měkké tkáni (přehledně v Uçar and Brantley, 2011; Joska *et al.*, 2009; Venclíková *et al.*, 2007).

Mechanickým opotřebením amalgámu (žvýkání, otírání) může docházet ke zvýšenému uvolňování elementární rtuti z dentálních výplní (Vimy and Lorscheider, 1985a), přitom uvolňována může být rtuť také ve formě organické nebo jejich korozních produktů (přehledně v Uçar and Brantley, 2011).

V následující tabulce (**Tab. 2**) je shrnuto složení vybraných dentálních amalgámů na trhu.

Tab. 2 **Složení základu jednotlivých dentálních amalgámů na trhu.** Rtuť bývá v amalgámu přibližně v poměru 1:1 k základu, jehož složení u vybraných dentálních amalgámů na trhu je uvedeno v tabulce.

	Dispersalloy® <sup>7</sup>	SECURALLOY <sup>8</sup>	SEPTALLOY <sup>9</sup> NO GAMA 2 - NG 70	SEPTALLOY <sup>10</sup> NO GAMA 2 - NG 50
Ag [hm. %]	69,3	60,0	70,0	50,0
Cu [hm. %]	11,8	12,0	11,0	20,0
Sn [hm. %]	17,9	28,0	18,5	30,0
Zn [hm. %]	1,0	-	0,5	-

Z amalgámových výplní dochází k uvolňování toxických sloučenin rtuti, zejména ve formě chloridu rtuťnatého HgCl<sub>2</sub>, který *in vitro* vazbou na bílkovinu (jako haptenu) podporuje proliferaci lidských lymfocytů v krvi. K aktivaci imunitních buněk je ovšem nutná mnohem vyšší koncentrace, než která byla nalezena *in vivo* v organismu. Ukazuje se, že preferenčně jsou sloučeninami HgCl<sub>2</sub> vázanými na bílkovinu aktivovány CD4+ T buňky, jejichž proliferace a aktivace dosahuje maximální hodnoty v 6. dni kultivace. K plné aktivaci T buněk je důležitá kooperace s CD14+ (koreceptor TLR4 pro rozpoznání LPS) buňkami (LOFTENIUS, EKSTRAND and MÖLLER, 1997).

Bylo objeveno, že u pacientů s prokázanou přecitlivělostí na rtuť a s autoimunitní thyroditidou médium po stimulaci PBMC roztokem HgCl<sub>2</sub> obsahuje SSB/La autoprotilátky. Dentální amalgám tedy může být významným faktorem při tvorbě protilátek proti jaderným antigenům (Bártová *et al.*, 2003). V porovnání s pacienty bez přecitlivělosti na rtuť dochází u osob s intolerancí rtuti ke snížené produkci IFN-γ a ke zvýšení počtu protilátek proti spermii v supernatantu lymfocytů po stimulaci solí rtuti (Podzimek *et al.*, 2005).

<sup>7</sup> Převzato z <http://www.dentsplymea.com/products/restorative/amalgams/dispersalloy>

<sup>8</sup> Převzato z <http://www.septodont.co.uk/products/securalloy?from=251&cat=7>

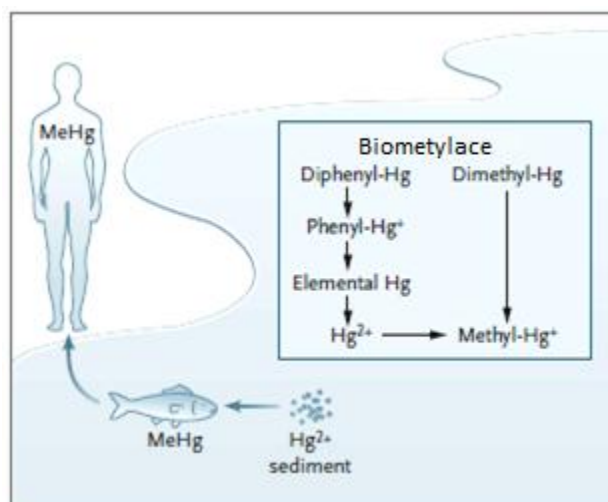
<sup>9</sup> Převzato z <http://www.septodont.co.uk/products/septalloy-ng-70?from=251&cat=7>

<sup>10</sup> Převzato z <http://www.septodont.co.uk/products/septalloy-ng-70?from=251&cat=7>

## Organická rtuť

Expozici rtuti ve formě  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  je dosaženo zejména požitím potravy bohaté na ryby a jiné mořské živočichy. Zasažen je především mozek, dochází k destrukci neuronů v mozkové kůře (zraková oblast) a k zániku granulárních buněk mozečku. Často se objevuje latentní fáze (týdny nebo měsíce) mezi expozicí rtutí a klinickými symptomy (přehledně v Clarkson *et al.*, 2003). Organizacemi WHO (Světová zdravotnická organizace) a EPA (Agentura pro ochranu životního prostředí) byla stanovena bezpečná dávka methylované rtuti, jedná se o rozmezí hodnot od 0,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  váhy/týden do 3,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  váhy/týden (Clements *et al.*, 2000).

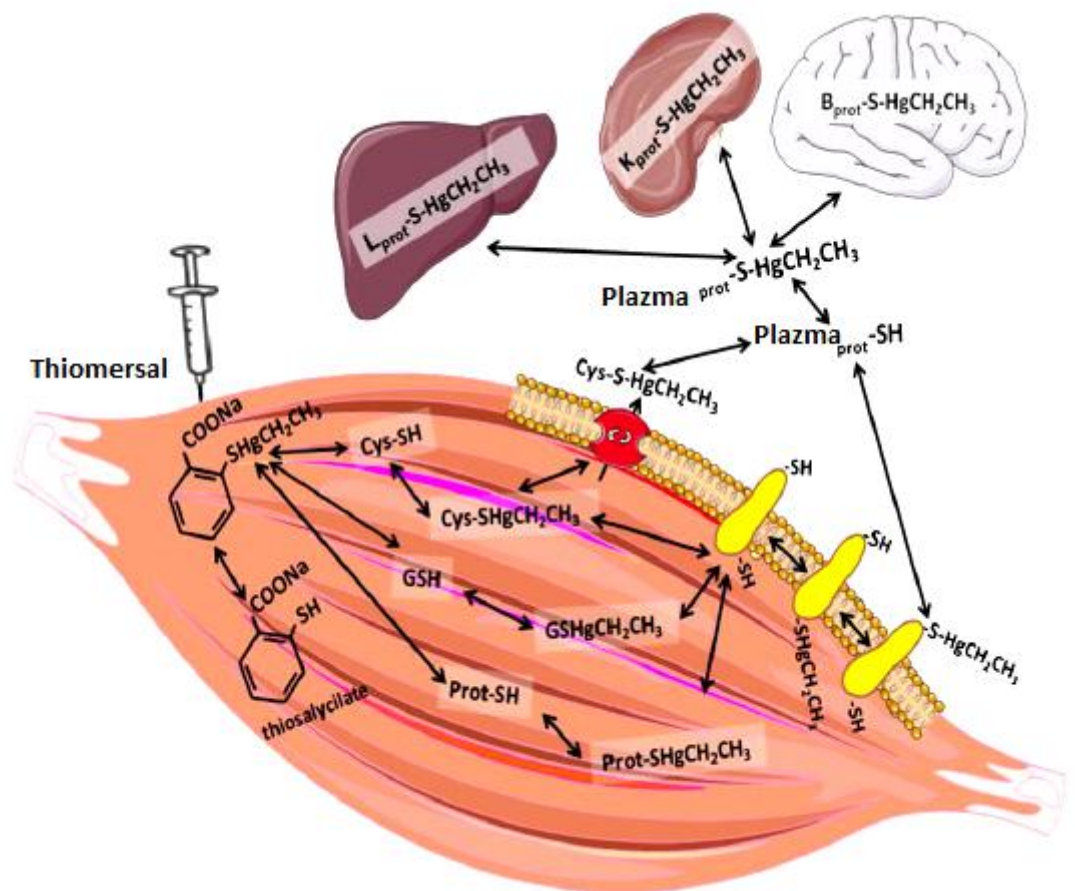
Vytvoření sloučenin rtuti  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  (biometylace) je znázorněno na následujícím obrázku **Obr. 2**.



**Obr. 2 Expozice organické rtuti.** Rtuť ve vodných sedimentech je přeměněna mikroorganismy na methylovanou rtuť ( $\text{MeHg}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ), která se dostává do těl mořských živočichů. Konzumací mořských ryb a jiných živočichů je intoxikován organickou rtutí člověk (převzato a upraveno z Clarkson *et al.*, 2003).

## Thiomersal

Thiomersal je organická sloučenina rtuti, která je využívána více než 60 let jako antimikrobiální látka ve vakcínách, například diphteria-tetanus-pertussis, tetanus toxoid, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* typ b. Nepoužívá se do živých bakteriálních nebo virových vakcín (Clements *et al.*, 2000). Schéma aplikace a distribuce thiomersalu v organismu po aplikaci vakcín je znázorněna na obrázku **Obr. 3**.



Obr. 3 Intramuskulární aplikace thiomersalu (ethylHg,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ ).

Po injekci thiomersalu dochází k uvolnění ethylHg (štěpením vazby síra-rtuť), která reaguje s thiolovými skupinami proteinů (Prot-SH) a nízkomolekulárními thioley (Cys-SH a redukovaný glutathion GSH). Z thiomersalu se dále štěpením uvolňuje thiosalicylát, který neoplývá významnými toxickými účinky. Komplex ethylHg-cystein ( $\text{Cys-SHgCH}_2\text{CH}_3$ ) může být exportován ze svalové buňky buď membránovým transportním proteinem do plazmy (protein znázorněn červeně) nebo výměnnou reakcí s membránovými proteiny obsahujícími thiolové skupiny (znázorněn žlutě). Komplexy ethylHg s GSH ( $\text{GSHgCH}_2\text{CH}_3$ ) mohou být transportovány pouze výměnnou reakcí přes transmembránový protein (znázorněn žlutě). Tyto komplexy mohou

být v plazmě přetvořeny vazbou Plazmaprot-SH (proteiny s thiolovými skupinami přítomné v plazmě). Nízko- a vysokomolekulární komplexy rtuti byly nalezeny v intersticiální tekutině a mohou se vyskytovat i v ledvinách ( $K_{\text{prot-S-HgCH}_2\text{CH}_3}$ ), játrech ( $L_{\text{prot-S-HgCH}_2\text{CH}_3}$ ) a mozku ( $B_{\text{prot-S-HgCH}_2\text{CH}_3}$ ) (převzato a upraveno z Dórea *et al.*, 2013).

Vyšší toxicitou se vyznačuje organická rtuť ve srovnání s anorganickou formou. Byl porovnáván vliv thiomersalu, methylované rtuti a  $\text{HgCl}_2$  v různých koncentracích na životnost leukemických buněk. Thiomersal byl účinný na snížení životnosti buněk již při koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ , methylovaná rtuť až při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  a anorganická rtuť ( $\text{HgCl}_2$ ) neovlivňovala životnost buněk (GUZZI *et al.*, 2012).

#### 4.2.2 Zinek

Zinek patří mezi esenciální stopové prvky a účastní se řady fyziologických funkcí v organismu. Má funkce katalytické, dále je strukturním prvkem metaloenzymů a významná je i jeho regulační funkce na buněčné úrovni. Hojně je využíván v dentálních výplních (přehledně v Yoshihisa and Shimizu, 2012).

Nanočástice oxidu zinečnatého  $\text{ZnO}$  vyvolávají apoptózu a nekrózu makrofágů, které se uplatňují při odstranění inhalovaných nanočástic a v regulaci imunitní odpovědi. Kultivací myší makrofágové buněčné linie docházelo k fragmentaci DNA a vytvoření apoptotických tělísek. Důležitou úlohu se zdá mít kaspáza-3 a účinkem  $\text{ZnO}$  dochází k aktivaci pouze vnitřní apoptotické kaskády. Dochází k oxidačnímu poškození DNA a vzniku reaktivních kyslíkových intermediátů účinkem NADPH-oxidázy (Wilhelmi *et al.*, 2013).

#### 4.2.3 Stříbro

Stříbro  $\text{Ag}$  je nejčastěji zastoupeno v dentálních materiálech ve formě slitin s cínem  $\text{Ag-Sn}$  a oba kovy jsou složkami dentálního amalgámu (viz **Tab. 2**). Studie se zabývala vlivem kovu na orální mukózní tkáň u pacientů s amalgámovou „tetovází“ nebo kovovými pigmentacemi v dutině ústní (Joska *et al.*, 2009; Venclíková *et al.*, 2007). Ve většině případů byly kovy  $\text{Ag-Sn}$  prokázány ve tkáni dutiny ústní. Stříbro tvoří stabilní sloučeniny  $\text{Ag}_2\text{S}$ , které jsou ukládány ve struktuře kolagenu, bazální membráně a buňkách vaziva (AOYAGI and KATAGIRI, 2004).

#### 4.2.4 Titan

V krvi pacientů s dentálními nebo kyčelními implantáty na bázi titanu nebo zirkonia byla prokázána zvýšená hladina IL-8. Interleukin IL-8 je produkován osteoblasty a například také monocyty v periferní krvi. U titanových implantátů docházelo *in vitro* k vyšší expresi genu pro IL-8 v porovnání se zirkoniem (Quabius *et al.*, 2012).

Titan se pro využití jako dentální materiál často upravuje. Alternativou je syntéza TiO<sub>2</sub> nanovrstvy na povrchu čistého titanu elektrochemickou oxidací na anodě. Průměr vytvořené vrstvy se udává kolem 70 - 100 nm a připravený dentální materiál má výbornou antibakteriální aktivitu (Cui *et al.*, 2012).

Další studie se zabývala aktivací imunitní odpovědi při kultivaci dendritických buněk s titanovými disky s různě upraveným povrchem. Titan před ošetřením, titan s povrchem pískovaným a leptaným kyselinou podporovaly maturaci dendritických buněk a zvýšení exprese CD86, zatímco po kultivaci DC s titanem s modifikovaným povrchem buňky vykazovaly nezralý fenotyp a aktivovaly protizánětlivou imunitní odpověď. Stimulací DC titanem před ošetřením bylo pozorováno zvýšení produkce MCP-1 v porovnání s titanem s modifikovaným povrchem. Modifikovaný titan se vyznačoval povrchem s vysokou hydrofilitou, neméně důležitý byl obsah kyslíku a titanu, který byl zvýšen v porovnání s ostatními povrchy. Drsnost povrchu modifikovaného titanu byla stejná jako u titanu pískovaného a leptaného (Kou *et al.*, 2011). Také bylo zjištěno, že titan (slitina Ti6Al4V) leptaný kyselinou vykazoval zvýšenou proliferaci osteoblastů a nízkou produkci prozánětlivých cytokinů, ve srovnání s titanovým povrchem leštěným, plazma-sprejovaným a s oxidem zirkoničitým ZrO<sub>2</sub> (Kubies *et al.*, 2011).

Pro meziobratlové použití byla testována biokompatibilita implantátu s titanovým povrchem a jádrem složeným z C/C (uhlík/uhlík) kompozitu. Kompozit C/C byl potažen polymerem o obsahu hydroxyethylmetakrylátu (HEMA). Bylo pozorováno zvýšení biotolerance a zvýšení tvorby nové kostní tkáně kolem implantovaného materiálu, pokud byl HEMA obohacen o 1 % kolagenu. Adheze a aktivace imunitních buněk na implantátu byly vyhodnoceny měřením prozánětlivých mediátorů TNF- $\alpha$  a IL-8 (chemokin). Byla zjištěna snížená hladina obou cytokinů u C/C kompozitu potaženého polymerem s obsahem HEMA (Pešáková *et al.*, 2005).

#### 4.2.5 Nikl

Nikl je velmi rozšířený například v mincích nebo bižuterii. Využití nachází také v ortopedii. Po vstupu do biologického systému často dochází ke korozi kovu a uvolnění iontů  $\text{Ni}^{2+}$ . Pozitivní reakce (přecitlivělost, kontaktní alergie) na nikl byla během studie pozorována až u 13,1 % sledovaných osob (Schäfer *et al.*, 2001).

Používanou slitinou je v posledních letech Nitinol s obsahem niklu a titanu. Tato slitina se vyznačuje tvarovou pamětí, a proto je používána zejména pro přípravu samorozpínacích stentů, okludérů nebo například obalů kardiostimulátorů. U sledované pacientky byl 3. den po vložení Amplatzerova okludéru pozorován vývoj těžkého generalizovaného exantému (výsev eflorescencí na kůži) s postupnou progresí. Amplatzerův okludér je mimo jiné používán ke katetrizačnímu uzavření perzistujícího foramen ovale, tj. otvoru v srdeční přepážce savců, nacházející se mezi pravou a levou síní. Potíže pacientky ustaly až po vyjmutí zařízení. Epikutánními testy byla u pacientky zjištěna přecitlivělost na nikl a proliferačním testem MELISA<sup>®</sup> byla objevena zvýšená reakce na nikl a zejména na titan (Bělohávková *et al.*, 2011).

Přecitlivělost na nikl je popisována jako reakce oddálené přecitlivělosti zprostředkovaná specifickými T buňkami, ale zdá se, že úlohu mohou mít i jiné imunitní buňky. Bylo objeveno, že NK buňky po stimulaci niklem produkují  $\text{IFN-}\gamma$ . Důležitou úlohu zde má receptor NK buněk NKG2D (Kim *et al.*, 2009).

Imunitní odpověď na nikl může být snížena působením Tr1 buněk (T regulatory cells 1), které se vyznačují produkcí cytokinů IL-10 a IL-5. Buňky Tr1 byly izolovány z kůže pacientů ošetřené  $\text{NiSO}_4$  a z jejich periferní krve. Tyto buňky se vyznačovaly expresí povrchových molekul CD25, CD28, CD30, CD26 a  $\beta 2$  řetězce receptoru pro IL-12. Při kultivaci monocytů s Tr1 klony buněk byla pozorována snížená schopnost stimulovat Th1 specifické buňky, mechanismem účinku je inhibice diferenciací dendritických buněk z monocytů jako účinných buněk prezentujících antigen. Tento inhibiční vliv je zprostředkován sekrecí IL-10 buněčnou populací Tr1 (Cavani *et al.*, 2000).

V zachování imunitní tolerance vůči niklu jsou důležité  $\text{CD25}^+$  regulační T lymfocyty (Tregs), které byly izolovány z periferní krve zdravých dobrovolníků a pacientů s přecitlivělostí na nikl. U pacientů s prokázanou reakcí na nikl byla objevena snížená nebo chybějící schopnost Tregs inhibovat efektorové  $\text{CD4}^+$  a  $\text{CD8}^+$  T buňky (Cavani *et al.*, 2003).

K aktivaci imunitní odpovědi po působení niklu na kůži dochází prostřednictvím Langerhansových buněk (LC), které jsou označovány jako nezralé dendritické buňky přítomné v kůži. Po stimulaci niklem migrují do lymfatických uzlin a aktivují T lymfocyty. K této migraci je zřejmě důležitý chemokinový receptor CCR7, jehož exprese je působením niklu, vázaném na bílkovinu (jako haptenu), zvyšována. K migraci LC do lymfatických uzlin má významnou roli IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ , jehož neutralizací dochází k částečnému potlačení exprese CCR7 po působení niklu (Boislève *et al.*, 2004).

Nikl stimuluje produkci IL-10 po kultivaci s PBMC a také byla zjištěna zvýšená produkce cytokinů IL-4, IL-13 a IFN- $\gamma$ . Pokud byl při kultivaci buněk přidán rekombinantní IL-10 (rIL-10) bylo pozorováno potlačení produkce všech zmíněných cytokinů. Vyšší mírou byla ovšem inhibována produkce IFN- $\gamma$  (Minang *et al.*, 2006b). Významnou úlohu by mohla mít populace  $\gamma\delta$  T buněk, jejichž počet byl zvýšen v krvi pacientů s prokázanou reakcí na nikl (vázaný na bílkovinu). Převažující buněčnou populací jsou CD4+ T buňky, které se vyznačují produkcí cytokinů IL-17, IL-22 a IFN- $\gamma$  (Dyring-Andersen *et al.*, 2013). V menším množství jsou aktivovány i CD8+ T buňky, které vyvolávají lýzu ostatních buněk a převažujícím lytickým mechanismem je působení perforinu (Moulon *et al.*, 2003).

Při stimulaci imunitní odpovědi na ionty niklu (Ni<sup>2+</sup>) byla prokázána úloha signalizačních kaskád IKK2/NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) a angiogenní kaskády zprostředkované faktorem HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor). Aktivací transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B dochází k vývoji zánětlivé imunitní odpovědi po expozici nikelnatých sloučenin. Stimulace HIF-1 $\alpha$  zahrnuje proliferaci, aktivaci metabolismu, signalizaci buněk a tvorbu prozánětlivých mediátorů, zejména interleukinu IL-6 (Viemann *et al.*, 2007).

V aktivaci imunitní odpovědi na ionty Ni<sup>2+</sup> mohou mít roli komplexy Ni<sup>2+</sup> s albuminem (HSA, lidský sérový albumin). Bylo prokázáno, že komplexy HSA-Ni podporují aktivaci T buněk. Přitom ani albumin, ani jeho N-terminální peptid, který váže nikl, neurčují antigenní specifitu. Také bylo pozorováno, že po rychlém pohlcení komplexů buňkami prezentujícími antigen, nedochází k vazbě těchto struktur na povrchu v asociaci s HLA antigeny (Thierse *et al.*, 2004).

Mnoho studií se zabývá snahou určit populaci buněk odpovědnou za vznik přecitlivělosti na kovy (alergické kontaktní dermatitidy). Na základě produkce chemokinů byla měřena migrace CD8+ a CD4+ T buněk, které byly aktivovány niklem. Faktory CCL17 (TARC, Thymus and Activation Regulated Chemokine) a CCL22 (MDC)



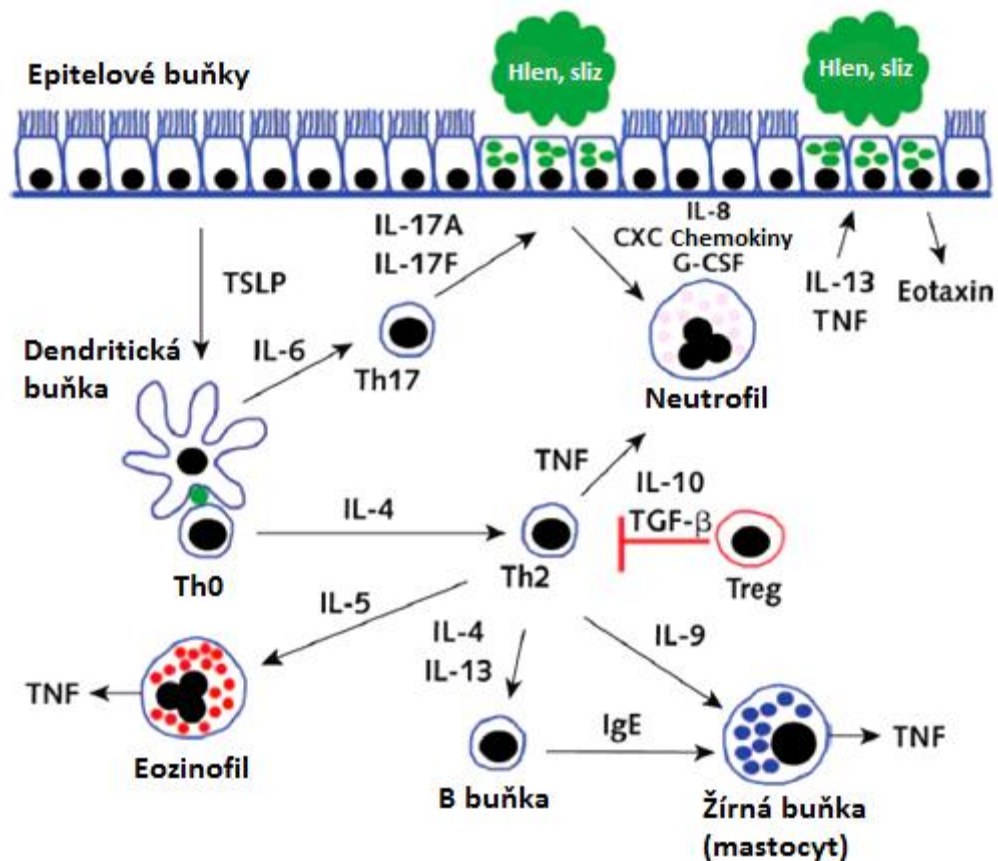
podporovaly ve třikrát vyšší míře migraci CD4<sup>+</sup> T buněk ve srovnání s CD8<sup>+</sup> T buňkami. Dvakrát více byly stimulovány buňky CD8<sup>+</sup> účinkem chemotaktického faktoru CXCL10 (IP-10, Interferon gamma-induced protein 10). Na populacích CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk byla pozorována zvýšená exprese molekul CCR4 a CXCR3, přičemž CCR4 byl nejvíce zastoupen na buňkách Th2 a nejméně na Tc (cytotoxické T lymfocyty). Naproti tomu CXCR3 byl objeven na buněčných populacích Tc a Th1 a nebyl nalezen na Th2 buňkách (Sebastiani *et al.*, 2002).

### 4.3 Alergická kontaktní dermatitida

Alergická kontaktní dermatitida (ACD) odpovídá IV. typu reakce oddálené přecitlivělosti. Kov se v organismu váže na proteiny (jako haptenu) za vzniku komplexu a je rozpoznáván glykoproteiny na povrchu Langerhansových buněk v kůži. Aby se vyvinula alergická reakce, je nutné, aby byl haptenu udržen v kůži po dobu 18 až 24 hodin. Langerhansovy buňky aktivované antigenem se dostávají do lymfatických uzlin a aktivují T buňky. Dochází ke vzniku paměťových a zejména efektorových T buněk, jejichž aktivace spouští další mechanismy v indukci kontaktní dermatitidy (přehledně v Brandão and Gontijo, 2012)

V patogenezi kontaktní dermatitidy má zřejmě velkou úlohu populace Th17 buněk, jejichž produktem je interleukin IL-17. V kůži pacientů s ACD byly objeveny infiltráty IL-17<sup>+</sup> T buněk, které se dělí do několika různých funkčních a fenotypem rozdílných skupin. Obecně známé Th17 převažují v kůži pacientů s ACD, buňky odpovídající na haptenu (nikl s bílkovinou) jsou ale pouze Th1 (IFN- $\gamma$ +IL-17<sup>+</sup>), Th0 (IFN- $\gamma$ +IL-17+IL-4<sup>+</sup>) a v menší míře i Th2 (IL-17+IL-4<sup>+</sup>) buňky. Pokud je přítomen IFN- $\gamma$ , buňky produkující IL-17 stimulují keratinocyty k uvolnění molekul CXCL8 (IL-8), IL-6 a HBD-2 (human beta defensin-2). Dochází ke zvýšené expresi molekuly ICAM-1 na povrchu keratinocytů, která je důležitá k jejich interakci s T buňkami a k vyvolání apoptózy keratinocytů (Pennino *et al.*, 2010). Přehled buněčných populací v kožních lézích je shrnut v **Tab. 3**.

Znázornění patogeneze alergické reakce na antigeny uvolněné v okolním prostředí je na **Obr. 4**.



Obr. 4 Schéma aktivace imunitní odpovědi po reakci na antigeny přítomné v okolním prostředí. Endoteliální buňky, fibroblasty a žírné buňky produkují TSLP (Thymic stromal lymphopietin), na který reagují dendritické buňky aktivací. Poté jsou DC schopny aktivovat diferenciaci naivních CD4+ T buněk do buněčné linie Th2, která produkuje hlavně cytokiny IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 a TNF. Dochází k aktivaci eozinofilů a žírných buněk, také B buněk, které začnou produkovat IgE. Výsledkem je také sekrece hlenu (slizu). Dendritické buňky produkují IL-6, který je důležitý pro diferenciaci Th2 a také Th17 buněk, které uvolňují IL-17. Interleukin IL-17 aktivuje bronchiální epitelální buňky k produkci CXC chemokinů (chemotaktických faktorů) a G-CSF (faktor stimuluje kolonie granulocytů), který je významným faktorem určujícím proliferaci granulocytů. Také je podporována tvorba mucinu. V regulaci imunitní odpovědi jsou důležité buňky Tregs, které sekretují tlumivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$  (převzato a upraveno ze Stewart and Sally, 2010).

K terapii kožních projevů kontaktní dermatitidy se používají glukokortikoidy. Jejich účinek zahrnuje inhibici produkce prostaglandinu D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) žírnými buňkami, ale současně stejnou koncentrací glukokortikoidu (dexamethason) nedochází k ovlivnění degranulace uvedených žírných buněk (Yamaura *et al.*, 2012). Imunosupresivní účinek

glukokortikoidů byl pozorován u pacientů s přecitlivělostí na nikl. Byl objeven zvýšený počet FOXP3+CD25+ T buněk (Tregs). Langerhansovy buňky vykazovaly v mnohem větší míře nezralý fenotyp, zvýšenou produkci TGF- $\beta$  a aktivaci exprese NF- $\kappa$ B (Stary *et al.*, 2011). Důležitou roli mají plazmacytoidní dendritické buňky, které byly prokázány v kůži pacientů. Vyznačovaly se povrchovými markery CD123, CD45RA, BDCA-2 a CD62L (Bangert *et al.*, 2003).

**Tab. 3 Přehled buněčných populací v kožních lézích po působení niklu.**

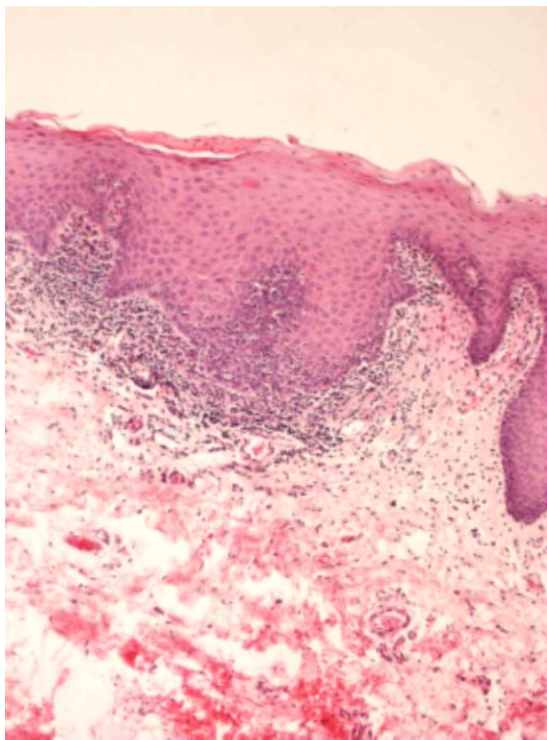
Data jsou uvedena jako počty buněk na 1 mm<sup>2</sup>, v normální kůži a v kůži pacientů s ACD po 72 hodinách po ošetření solí niklu (převzato a upraveno z Bangert *et al.*, 2003).

		Epidermis		Dermis	
Buněčný typ	Antigen (marker)	Normální kůže	Epikutánní (kožní) test po 72 h	Normální kůže	Epikutánní (kožní) test po 72 h
Leukocyty	CD45	14	31	86	435
T buňky	CD3	3	21	40	513
Th buňky	CD3/CD4	2	17	20	397
Tc buňky	CD3/CD8	1	7	9	134
pDC	CD123/CD45RA	0	4	1	40
Langerhansovy buňky	Langerin	28	18	1	18
Langerhansovy buňky	CD1a	19	12	14	45
Kožní dendritické buňky	CD1c	5	17	24	97
Zralé Langerhansovy buňky	CD1a/CD83	1	4	1	15
Zralé kožní dendritické buňky	CD1c/CD83	1	1	6	11
Makrofágy	CD14	0	2	15	31
Neutrofily	CD15	0	0	0	30

## 4.4 Lichen planus

Lichen planus je zařazován mezi chronická zánětlivá onemocnění, která se často vyskytují v dutině ústní. U pacientů s lichenoidní reakcí byla v dutině ústní prokázána vyšší hladina mikroorganismů *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola* (Seckin Ertugrul *et al.*, 2013).

V dutině ústní mohou vznikat působením dentálních materiálů (kovů), akrylátů a jiných látek různé lichenoidní léze (viz **Obr. 5**) (Ditrichova *et al.*, 2007).

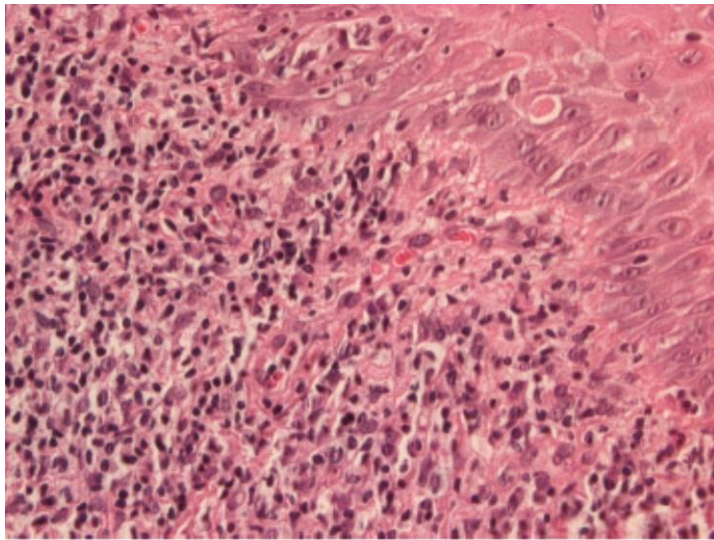


Obr. 5 **Lichenoidní reakce v dutině ústní** (převzato z Ditrichova *et al.*, 2007).

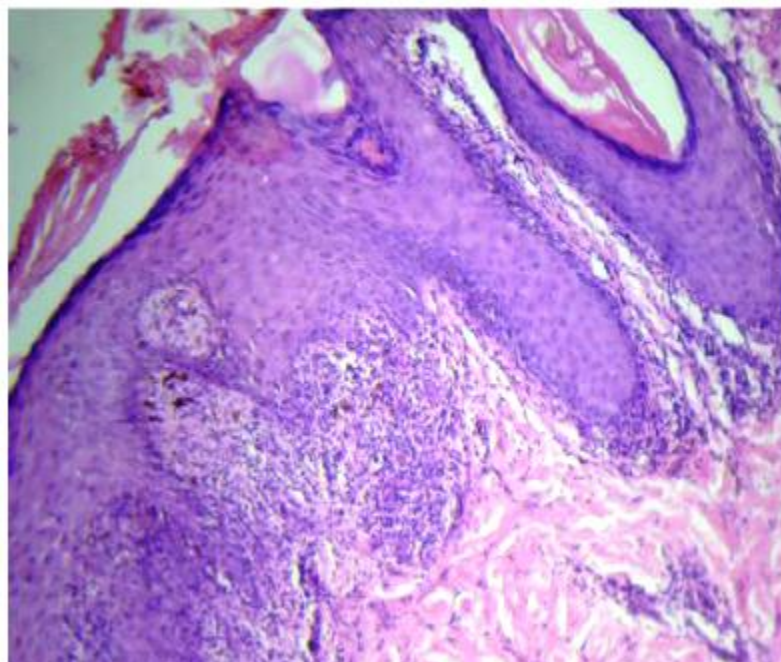
V séru pacientů s erozivní formou onemocnění lichen planus byla objevena zvýšená hladina interleukinu IL-17 ve srovnání s lehčí formou onemocnění a kontrolní skupinou. Docházelo ke vzniku zánětu a atrofii tkání (Pouralibaba *et al.*, 2013). V chronických zánětlivých onemocněních byla objevena úloha angiogenních faktorů, například VEGF (vascular endothelial growth factor). Pacientům s projevem lichenu planus byla v séru prokázána vyšší hladina VEGF oproti zdravým kontrolám (Mardani *et al.*, 2012).

Rozlišujeme orální lichen planus (OLP) a orální lichenoidní reakci (OLR). Bylo objeveno, že pacienti s lichenoidní reakcí se vyznačují vyšším počtem degranulovaných

žirných buněk a TNF- $\alpha$  (Ghalayani *et al.*, 2012). Na **Obr. 6 a 7** jsou znázorněny histologické preparáty lichenoidních lézí.



Obr. 6 **Detail bazální membrány u lichenoidních lézí** (převzato z Ditrichova *et al.*, 2007).



Obr. 7 **Lichen planus**; hypergranulóza, změna bazálních buněk a infiltrace lymfocytů (převzato z Kumar *et al.*, 2013).

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Použité chemikálie

RPMI 1640 (Gibco)

HISTOPAQUE<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, USA)

Glutamin (Sigma-Aldrich, USA)

Gentamycin (Lek Pharmaceuticals d.d., Slovinsko)

Türkův roztok (VAKOS XT a.s., Praha)

X-VIVO<sup>™</sup> 10 (Lonza, Basilej, Švýcarsko)

Pokeweed mitogen (Sigma-Aldrich, USA)

Thymidin (PerkinElmer, USA)

HgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

Na<sub>3</sub>Au(S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Chemotechnique Diagnostics AB, Švédsko)

PdCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

CdCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

TiO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

CH<sub>3</sub>COOAg (Sigma-Aldrich, USA)

Thiomersal (Loba Chemie, Rakousko)

NH<sub>4</sub>PtCl<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, USA)

ZnSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

MoO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

ZrO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, USA)

Voda pro injekce (Fresenius Kabi, Verona, Itálie)

RayBio<sup>®</sup> Human Cytokine Antibody Array membrány (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

Primární protilátka konjugovaná s biotinem (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

Streptavidin značený křenovou peroxidázou (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

Blokující pufr (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

Promývací pufr I a II (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

Detekční pufr C a D (RayBiotech, Inc., Norcross, USA)

### **5.1.2 Použité přístroje**

Laminární box HLB 2448 (HERAEUS LAMINAIR<sup>®</sup>)

Termostat BT 120 upravený pro CO<sub>2</sub> atmosféru (Laboratorní přístroje Praha)

Optický mikroskop (KORAX)

Centrifugy ROTOFIX 32A a UNIVERSAL 16 (Hettich ZENTRIFUGEN)

Harvestor (Inotech, Švýcarsko)

Mikrobeta (LKB/Wallac, Finsko)

LAS-1000 luminiscenční detektor (Fujifilm, Tokio, Japonsko)

### **5.1.3 Použité programy**

AIDA 3.28 Image Analyzer for Windows (Raytest, Straubenhardt, Německo)

GraphPad Prism<sup>®</sup> (GraphPad Software, USA)

STATISTICA 10 (Statsoft, USA)

SPSS 17.0 (IBM, USA)

### **5.1.4 Pacienti**

Ke studiu byli vybráni pacienti, u kterých byla před 12 lety prokázána přecitlivělost na kovy a z toho plynoucí nežádoucí účinky. Po letech jsou v rámci vědecké práce na grantech opět vyšetřeni a znovu byla provedena také MELISA<sup>®</sup> (test proliferace lymfocytů), abychom mohli porovnat, jak se změnila imunitní reakce na kovy po průměrně 12 letech. V následující tabulce (**Tab. 4**) je uveden seznam pacientů a rozdělení do skupin.

Tab. 4 **Seznam pacientů a přehled skupin.** Proliferace lymfocytů se uvádí v hodnotách stimulačního indexu (SI). Tabulka zahrnuje u každého pacienta kov, na který pacient nejvíce reagoval před 12 lety, tj. kov s nejvyšší hodnotou SI. Dále je znázorněno, jestli byly pacientům odstraněny kovy z dutiny ústní, trpí-li alergií a jiným onemocněním a pokud se v rodině vyskytují podobné potíže, resp. nežádoucí projevy přítomnosti kovových dentálních materiálů v dutině ústní.

Číslo pacienta	Věk	Kov s nejvyšším SI před 12 lety	Kovy v dutině ústní	Onemocnění	Alergie	Rodinná anamnéza
84/1997	66	HgCl <sub>2</sub>	ANO	Atrofie sliznice	ano	Pozitivní
436/06-106	72	HgCl <sub>2</sub>	ANO	Ústní dyskomfort	ano	Pozitivní
422/07-113	56	HgCl <sub>2</sub>	NE	Kožní alergie	ano	Pozitivní
395/06-92	60	HgCl <sub>2</sub>	ANO	Odhojené implantáty	ne	Pozitivní
431/07-79	67	TiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ano	Pozitivní
95/2002	76	NiCl <sub>2</sub>	ANO	Ústní dyskomfort	ano	Negativní
441/2002	37	HgCl <sub>2</sub>	NE	Deprese	ne	Pozitivní
156/2002	60	HgCl <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ano	Negativní
137/2001	58	HgCl <sub>2</sub>	NE	Atrofie sliznice	ano	Pozitivní
191/2000	60	CH <sub>3</sub> COOAg	NE	Ústní dyskomfort	ano	Negativní
189/2003	76	HgCl <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ano	Negativní
74/1998	63	NiCl <sub>2</sub>	NE	Atrofie sliznice	ano	Pozitivní
203/2001	57	NiCl <sub>2</sub>	NE	Alergie	ano	Pozitivní
67/2002	43	HgCl <sub>2</sub>	NE	Alergie	ano	Negativní
204/2002	71	HgCl <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ano	Negativní
210/1997	67	NiCl <sub>2</sub>	NE	Atrofie sliznice	ne	Negativní
240/2001	67	NiCl <sub>2</sub>	ANO	Ústní dyskomfort	ano	Pozitivní
238/2002	57	HgCl <sub>2</sub>	NE	Atrofie sliznice	ano	Pozitivní
209/2001	63	NiCl <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ne	Negativní
242/2003	62	HgCl <sub>2</sub>	NE	Implantáty	ano	Pozitivní
269/1996	84	NiCl <sub>2</sub>	ANO	Atrofie sliznice	ne	Negativní
244/1999	48	NiCl <sub>2</sub>	NE	Ústní dyskomfort	ne	Negativní



V dalších tabulkách (**Tab. 5 a 6**) je uvedeno porovnání skupin pacientů.

**Tab. 5 Porovnání skupin pacientů HgCl<sub>2</sub> a NiCl<sub>2</sub>.** Pacienti byli rozdělení podle kovu, na který vykazovali nejvyšší reakci před 12 lety, tj. nejvyšší hodnotu SI (rtuť nebo nikl).

	Skupina HgCl <sub>2</sub>	Skupina NiCl <sub>2</sub>
Počet pacientů [%]	55	36
Průměrný věk	60 let	66 let
Kovy v dutině ústní (ANO) [% pacientů]	25	38
Ústní dyskomfort [% pacientů]	33	50
Atrofie sliznice [% pacientů]	25	38
Alergie (ANO) [% pacientů]	83	50
Rodinná anamnéza pozitivní [% pacientů]	67	38

**Tab. 6 Porovnání skupin pacientů.** V tabulce je znázorněn přehled všech pěti skupin pacientů a zejména průměrný počet let mezi provedenými testy proliferace lymfocytů.

		Počet pacientů (celkem 22)	Průměrný počet let mezi testy proliferace	Průměr za skupinu (počet let mezi testy proliferace)
Monocyty stimulovány	HgCl <sub>2</sub>	12	10	12
	NiCl <sub>2</sub>	8	14	
Kovy v dutině ústní	ANO	6	12	12
	NE	16	12	
Onemocnění	Ústní dyskomfort	10	11	13
	Atrofie sliznice	6	15	
Alergie	ANO	16	11	12
	NE	6	13	
Rodinná anamnéza	Pozitivní	12	11	12
	Negativní	10	13	

## 5.2 Metody

### 5.2.1 Odběr krve

Pacientům bylo odebíráno 30 ml venózní krve do zkumavek Vacutainer s povrchovou úpravou proti srážení krve a 10 ml do zkumavek Vacutainer s obsahem gelu, které slouží k separaci séra. Pacienti vyplňují dotazník k metodě MELISA<sup>®</sup>, který blíže popisuje jejich anamnézu a celkový zdravotní stav (viz **Přílohy**).

### 5.2.2 Izolace mononukleárních buněk (PBMC) z periferní krve

Krev byla doplněna médiem RPMI 1640 (Gibco) v poměru 1:1, byla navrstvena na Ficoll HISTOPAQUE<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, USA) a centrifugována 30 minut při 600 g. Pipetou byl odebrán prstenec mononukleárních buněk v interfázi, které byly dále promývány médiem RPMI 1640. Buňky byly centrifugovány 10 minut při 400 g, médium bylo odstraněno a fáze promytí byla opakována (centrifugace 10 minut 200 g). Po odstranění média bylo k buňkám přidáno 5 ml média RPMI 1640 s obsahem 20 % autologního séra (inaktivovaného 45 minut při 56 °C), buňky byly spočítány (50  $\mu$ l buněk a 950  $\mu$ l Türkova roztoku, který byl naředěn 1:5 destilovanou vodou, počítáno 50 čtverců), směs byla přenesena do 50 ml kultivační lahvičky Falcon a vložena na 40 minut do termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou při 37 °C pro adhezenci monocytů. PBMC byly přeneseny do zkumavky, jejíž objem byl doplněn médiem RPMI 1640 na 10 ml a následně byly buňky znovu spočítány v Türkově roztoku a Bürkerově komůrce (50  $\mu$ l buněk a 950  $\mu$ l Türkova roztoku, počítáno 50 čtverců). Buňky byly naředěny na koncentraci  $1 \cdot 10^6$  buněk/ml v médiu RPMI 1640 s přidaným glutaminem (30 mg/100 ml média) a gentamycinem (20  $\mu$ g/ml). A dále kultivovány se solemi kovů po dobu 5 dní.

### 5.2.3 Izolace monocytů z periferní krve a jejich stimulace solemi kovů

Monocyty byly izolovány z frakce PBMC buněk z periferní krve adhezencí na povrch kultivační lahvičky (po dobu 40 minut v termostatu s 5% CO<sub>2</sub> atmosférou a při 37°C). Po adhezenci 40 minut byl povrch kultivační lahve opláchnut médiem X VIVO<sup>™</sup> 10 pro odstranění zvytkových lymfocytů. K adherovaným monocytům v kultivační lahvi bylo přidáno médium X VIVO<sup>™</sup> 10 (Lonza). Počet adherentních buněk byl vypočítán z rozdílu počtu buněk před adhezencí a po adhezenci. K monocytům bylo přidáno 50  $\mu$ l soli

kovu (při koncentraci buněk  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ ), na který pacient reagoval při prvním provedeném testu proliferace lymfocytů (před 12 lety). Monocyty v kultivační lahvi se solemi vybraných kovů byly ponechány 5 dní v termostatu. Poté byl supernatant buněk odebrán a byla stanovena produkce cytokinů metodou RayBio<sup>®</sup> Human Inflammation Antibody Array 3.

#### 5.2.4 Kultivace PBMC (po odstranění adherentních monocytů) se solemi kovů k průkazu proliferace lymfocytů

Ve 48 jamkové destičce byl kultivován 1 ml buněčné suspenze (koncentrace  $10^6/\text{ml}$ ) s obsahem 50  $\mu\text{l}$  roztoku sloučenin kovů. PBMC jsou stimulovány solemi kovů o dvou koncentracích. V jamce označené „2“ je přítomen kov 20krát ředěný. Jako negativní kontrola jsou použity buňky v médiu (nestimulovaná kultura; v **Tab. 7** označeno jako „kontrola 1 a 2“) a jako pozitivní kontrola mitogen Pokeweed (PWM, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma-Aldrich, USA). Rozmístění roztoků kovů je znázorněno v **Tab. 7**. Vzorky jsou kultivovány v termostatu po dobu 5 dní.

Tab. 7 Rozmístění roztoků kovů na kultivační destičce

kontrola 1	kontrola 2		PWM 1	PWM 2		HgCl <sub>2</sub> 1	HgCl <sub>2</sub> 2
Zn 1	Zn 2	ZrO <sub>2</sub> 1			ZrO <sub>2</sub> 2	Thio 1	Thio 2
Ag 1	Ag 2	Al 1	Al 2	Au 1	Au 2	Cd 1	Cd 2
Co 1	Co 2	Cr 1	Cr 2	Cu 1	Cu 2	Fe 1	Fe 2
Mo 1	Mo 2	Ni 1	Ni 2	Pb 1	Pb 2	Pd 1	Pd 2
Pt 1	Pt 2	Sn 1	Sn 2	TiO <sub>2</sub> 1	TiO <sub>2</sub> 2	TiCl <sub>3</sub> 1	TiCl <sub>3</sub> 2

Roztoky kovů byly připraveny podle následující tabulky (**Tab. 8**).

Tab. 8 **Zásobní a pracovní roztoky kovů**; zkratka TV označuje vodu pro injekce.

<b>KOVOVÉ SLOUČENINY</b>	<b>ZÁSObNÍ ROZTOK (ZR)</b>	<b>PRACOVNÍ ROZTOK</b>
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 ; (\text{AlCl}_3)$	2 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{CH}_3\text{COOAg}$	1,2 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{Na}_3\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,4 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg/1 ml	5 ml ZR
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2 mg/1 ml	50 $\mu\text{l}$ ZR + 4,95 ml TV
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	2 mg/1 ml	5 ml ZR
$\text{HgCl}_2$	2 mg/1 ml	50 $\mu\text{l}$ ZR + 4,95 ml TV
Thiomersal	1 mg/10 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	5 mg/1 ml	1 ml ZR + 4 ml TV
$\text{PdCl}_2$	2,4 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{NH}_4\text{PtCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg/1 ml	1 ml ZR + 4 ml TV
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg/1 ml	5 ml ZR
$\text{TiO}_2$	10 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{TiCl}_3$	10 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV
$\text{ZnSO}_4$	2 mg/10 ml	50 $\mu\text{l}$ ZR + 4,95 ml TV
$\text{MoO}_3$	5 mg/1 ml	1 ml ZR + 4 ml TV
$\text{ZrO}_2$	10 mg/1 ml	500 $\mu\text{l}$ ZR + 4,5 ml TV

### 5.2.5 MELISA<sup>®</sup> (test proliferace lymfocytů)

Po kultivaci PBMC se solemi kovů byl obsah jamek promíchán a 250  $\mu$ l bylo přeneseno do dvou jamek nové 96 jamkové destičky pro tkáňové kultury. Do jamek bylo přidáno 30  $\mu$ l naředěného <sup>3</sup>H Thymidinu (4 mBq/ml). Destička byla 4 hod ponechána v termostatu a poté byly vzorky sklizeny v harvestoru Inotech (Švýcarsko) na filtrační papír Filtermat A (Wallac Finsko) a usušeny. Vzorky byly zataveny s tuhým scintilačním roztokem (Meltilex A, Wallac, Finsko) a reakce změřena přístrojem Mikrobeta (LKB/Wallac, Finsko).

Proliferační reakce byla hodnocena jako stimulační index (SI), který je definován jako poměr výsledků získaných stimulací PBMC solemi kovů a výsledků z nestimulované kultury lymfocytů.

$$SI = \frac{\text{stimulovaná kultura}}{\text{nestimulovaná kultura}} \text{ cpm}$$

Hodnocení výsledků:

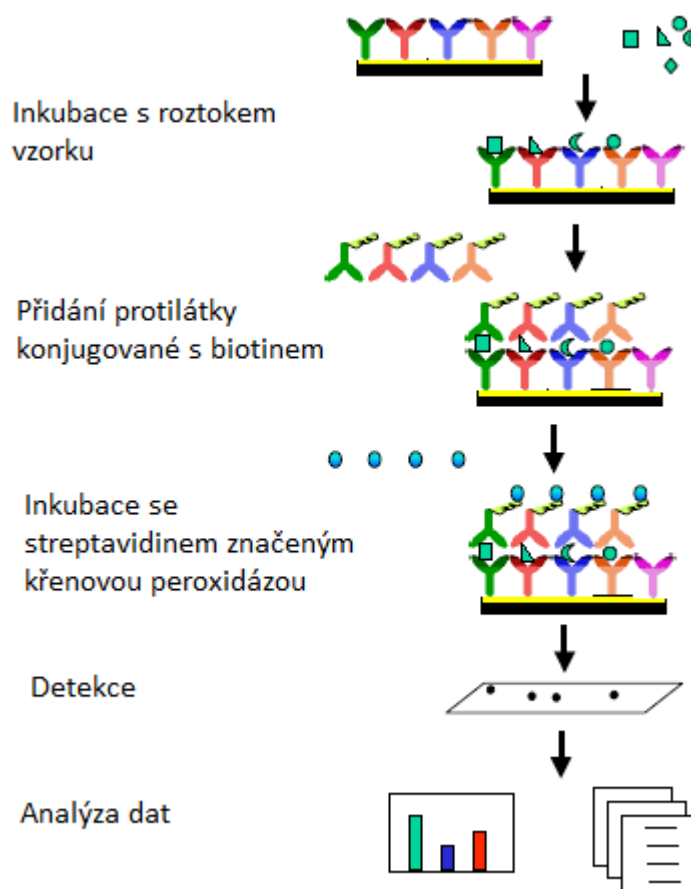
SI menší než 1,5 = negativní reakce

SI 1,5 – 2 = mírně pozitivní reakce

SI 2 – 5 = pozitivní reakce

SI vyšší než 5 = silně pozitivní reakce

### 5.2.6 RayBio<sup>®</sup> Human Inflammation Antibody Array 3



Obr. 8 Schéma postupu metody RayBio<sup>®</sup> (RayBiotech)

1. Membrány s navázanými protilátkami proti cytokinům byly vloženy do 8 jamkové destičky.
2. K membránám byly přidány 2 ml blokujícího pufru a takto byly ponechány 30 minut při pokojové teplotě.
3. Blokující pufr byl odstraněn a membrány byly inkubovány s 1 ml roztoku vzorku (supernatant buněk) za pokojové teploty po dobu 1,5 hodin.
4. Roztok vzorku byl odstraněn a membrány promyty třikrát 2 ml promývacího pufru I po dobu 5 minut (promývací pufr I byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:20).
5. Membrány byly promyty dvakrát 2 ml promývacího pufru II po dobu 5 minut (promývací pufr II byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:20).

6. Protilátka s navázaným biotinem byla naředěna v 2 ml blokujícího pufru. Ke každé membráně byl přidán 1 ml naředěné primární protilátky a takto byly ponechány při 4 °C přes noc.
7. Roztok byl odstraněn a membrány promyty třikrát 2 ml promývacího pufru I po dobu 5 minut (promývací pufr I byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:20).
8. Membrány byly promyty dvakrát 2 ml promývacího pufru II po dobu 5 minut (promývací pufr II byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1:20).
9. Ke každé membráně byly přidány 2 ml roztoku streptavidinu značeného křenovou peroxidázou, který byl naředěn 1000krát v blokujícím pufru. Membrány byly ponechány 2 hodiny při pokojové teplotě.
10. Membrány byly promyty kroky 7 a 8.
11. Ke každé membráně bylo přidáno 250 µl detekčního pufru C a 250 µl detekčního pufru D. Membrány byly ponechány 2 minuty, následně osušeny, přeneseny na plastickou fólii a byla detekována produkce cytokinů luminiscenčním detektorem LAS-1000. Výsledky byly vyhodnoceny obrazovou analýzou programem AIDA 3.28. Přehled stanovovaných cytokinů a umístění specifických protilátek na membráně je znázorněno v **Tab. 9**.

**Tab. 9 Schéma rozmístění protilátek proti cytokinům na membráně RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3 (RayBiotech)**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	Edaxin 1	Edaxin 2	G-CSF	GM CSF	ICAM 1	IFN gamma	I-309	IL-1 alpha
2	POS	POS	NEG	NEG	Edaxin 1	Edaxin 2	G-CSF	GM CSF	ICAM 1	IFN gamma	I-309	IL-1 alpha
3	IL-1 beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6 sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
4	IL-1 beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6 sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
5	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	P-10	MCP 1	MCP 2	M CSF	MG	MP-1 alpha	MP-1 beta	MP-1 delta
6	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	P-10	MCP 1	MCP 2	M CSF	MG	MP-1 alpha	MP-1 beta	MP-1 delta
7	RANTES	TGF beta1	TNF alpha	TNF beta	sTNFRI	sTNFRII	PDGF BB	TIMP 2	BLANK	BLANK	NEG	POS
8	RANTES	TGF beta1	TNF alpha	TNF beta	sTNFRI	sTNFRII	PDGF BB	TIMP 2	BLANK	BLANK	NEG	POS

### 5.2.6 Statistické zpracování dat

Všechny analyzované hodnoty byly nejprve testovány na shodu s normálním rozdělením (prostřednictvím testů šikmosti, špičatosti a Kolmogorov-Smirnovovým testem). Statisticky významné rozdíly v produkci cytokinů monocyty a v proliferaci lymfocytů u 22 pacientů, seskupených podle pěti kritérií (1. Reakce na kovy /Hg - Ni/; 2. Přítomnost kovů v dutině ústní /Ano-Ne/; 3. Typ onemocnění /Atrofie-Ústní dyskomfort/; 4. Alergie /Ano-Ne/; 5. Rodinná anamnéza /Pozitivní-Negativní/, byly vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem a paralelně neparametrickým testem Mann-Whitney (pro případ nenormálně rozdělených veličin). Rozdíly mezi párově naměřenými hodnotami (dvojice měření cytokinů a proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní) byly testovány párovým t-testem a neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem. Trendy změn mezi párovými dvojicemi odběrů u každé ze skupin byly navíc testovány interakčním efektem v ANOVA modelu dvojného třídění s jedním faktorem opakování (dvojice měření) a jedním faktorem fixním (skupina). Statisticky nejvýznamnější výsledky jsou prezentovány ve formě tabulek, zahrnujících p-hodnoty statisticky významných výsledků, a grafů s vyznačenými signifikantními p-hodnotami (sloupcové grafy) a grafů dvojic měření, kde jsou zobrazeny průměrné hodnoty produkce cytokinů/proliferace lymfocytů a střední chyba průměru.



## 6 Výsledky

### 6.1 Validace metody RayBio®

Na membránách RayBio® jsou protilátky proti cytokinům zakotveny vždy ve dvojici, a proto jsme statisticky hodnotili data ve snaze interpretovat rozdíly mezi dvěma měřeními každého cytokinu. Cílem je zhodnocení metody a zjištění reprodukovatelnosti získaných dat.

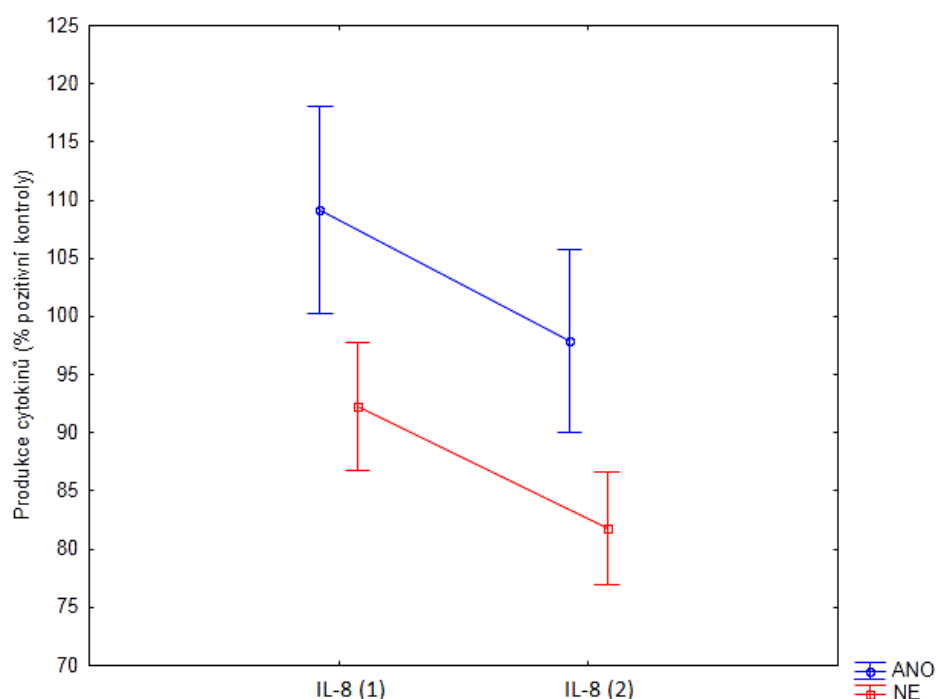
Schéma rozmístění protilátek proti cytokinům na membráně je znázorněn v **Tab. 9** (viz **5.2 Metody**).

Tab. 10 **Přehled rozdílů naměřených hladin dvojic jednotlivých cytokinů**. Žlutě je znázorněna statistická významnost na hladině  $p < 0,05$ , zeleně  $p < 0,01$ , červeně podbarvená data znamenají vysoce významnou statistickou významnost s hodnotou  $p < 0,001$ . Data byla statisticky zpracována neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem v rámci každé skupiny (sloupce).

	HgCl <sub>2</sub>	NiCl <sub>2</sub>	Kovy v dutině ústní			HgCl <sub>2</sub>	NiCl <sub>2</sub>	Kovy v dutině ústní	
			ANO	NE				ANO	NE
	p - hodnota	p - hodnota	p - hodnota			p - hodnota	p - hodnota		
TNF-α	0,010	0,017	0,028	0,005	IL-6sR	0,034	0,012	0,116	0,001
EOTAXIN	0,136	0,398	0,686	0,016	IL-7	0,308	0,043	0,465	0,050
EOTAXIN-2	0,002	0,012	0,028	0,000	IL-13	0,665	0,012	0,463	0,057
GCSF	0,008	0,012	0,028	0,004	IL-15	0,182	0,021	0,917	0,002
GM-CSF	0,002	0,027	0,043	0,001	IL-16	0,388	0,035	0,249	0,140
ICAM-1	0,008	0,012	0,116	0,001	IL-17	0,388	0,528	0,463	0,932
IFN-γ	0,019	0,262	0,753	0,016	IP-10	0,328	0,674	0,600	0,594
IL-12p70	0,665	0,017	0,345	0,569	MCP-1	0,272	1,000	0,116	0,438
TNF-β	0,814	0,327	0,917	0,394	MCP-2	0,023	0,735	0,344	0,167
IL-8	0,003	0,017	0,046	0,001	M-CSF	0,433	0,208	0,116	0,394
IL-10	0,005	0,069	0,173	0,003	MIG	0,136	0,750	0,340	0,278
IL-11	0,182	0,208	0,400	0,074	MIP-1α	0,937	0,161	0,917	0,569
IL-12p40	0,002	0,012	0,028	0,001	MIP-1β	0,695	0,208	0,463	0,438
I-309	0,075	0,036	0,686	0,020	MIP-1δ	0,037	0,012	0,345	0,002
IL-1α	0,158	0,263	0,116	0,320	RANTES	0,002	0,012	0,028	0,000
IL-1β	0,844	0,483	0,463	0,324	TGF-β1	0,005	0,012	0,046	0,001
IL-2	0,075	0,672	0,225	0,489	PDGF	0,937	0,208	0,917	0,733
IL-3	0,007	0,025	0,028	0,010	TIMP-2	0,530	0,161	0,917	0,816
IL-4	0,239	0,395	0,345	0,190	sTNF RI	0,347	0,208	0,345	0,093
IL-6	0,015	0,050	0,046	0,052	sTNF RII	0,695	0,208	0,917	0,820

Data v **Tab. 10** jsou rozdělena na dvě skupiny podle kovu, který byl použit ke stimulaci monocytů ( $\text{HgCl}_2/\text{NiCl}_2$ ) a podle přítomnosti kovů v dutině ústní (ANO/NE). Je patrný značný rozdíl mezi dvojicemi cytokinů. Vyšší statistické významnosti ( $p < 0,01$ ) se objevují zejména ve skupině  $\text{HgCl}_2$  v porovnání s druhou skupinou a na hladině  $p < 0,001$  u skupiny pacientů s odstraněnými kovy z dutiny ústní. Pro další účely jsme proto použili zprůměrované hodnoty dvojic měřených cytokinů.

Rozdíly hladin IL-8 mezi dvěma měřeními na membráně jsou znázorněny na následujícím grafu (viz **Obr. 9**).

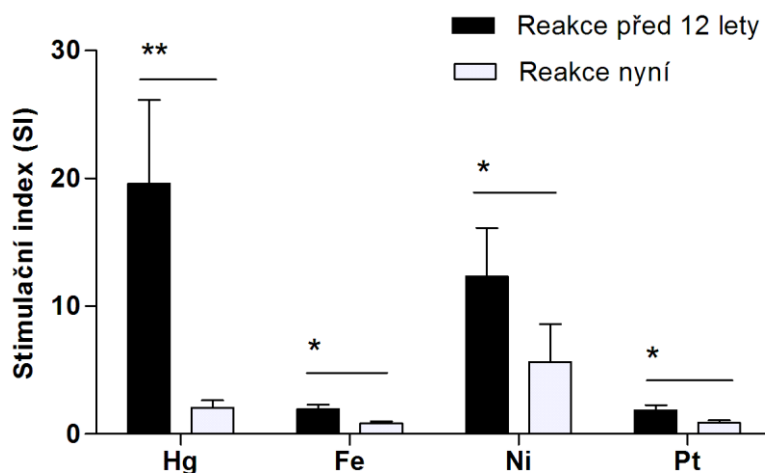


**Obr. 9 Přehled rozdílů mezi dvěma měřeními IL-8 na membráně RayBio®.**

V grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty produkce IL-8 po stimulaci monocytů solemi rtuti, niklu, stříbra nebo oxidy titanu a zirkonia (vyjádřeno v % pozitivní kontroly). Sůl kovu byla k buňkám přidána v koncentraci  $50 \mu\text{l} / 10^6$  buněk v ml. Hodnoty IL-8 (1) a IL-8 (2) jsou dvojice měření IL-8 na membráně RayBio®. Data v grafu jsou zobrazena pro skupinu pacientů s kovy v dutině ústní (ANO, modře zvýrazněno) a porovnání s pacienty, kterým byly kovy z úst odstraněny (NE, červeně). Detekce produkce cytokinů byla provedena luminiscenčním detektorem LAS-1000. Data byla analyzována programem AIDA 3.28. Svislými úsečkami jsou znázorněny střední chyby průměru. Trendy změn mezi párovými dvojicemi odběrů u každé ze skupin byly testovány interakčním efektem v ANOVA modelu dvojnásobného třídění s jedním faktorem opakování (dvojice měření) a jedním faktorem fixním (skupina-  $\text{HgCl}_2 / \text{NiCl}_2$ ).

## 6.2 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní po stimulaci PBMC solemi kovů u pacientů po odstranění kovů z dutiny ústní

Byla porovnána proliferace lymfocytů po kultivaci se solemi kovů (vyjadřovaná ve formě stimulačního indexu) před 12 lety a nyní u pacientů, kterým byly z dutiny ústní odstraněny kovové dentální materiály. Signifikantní změny v proliferačních testech jsou znázorněny na **Obr. 10**.

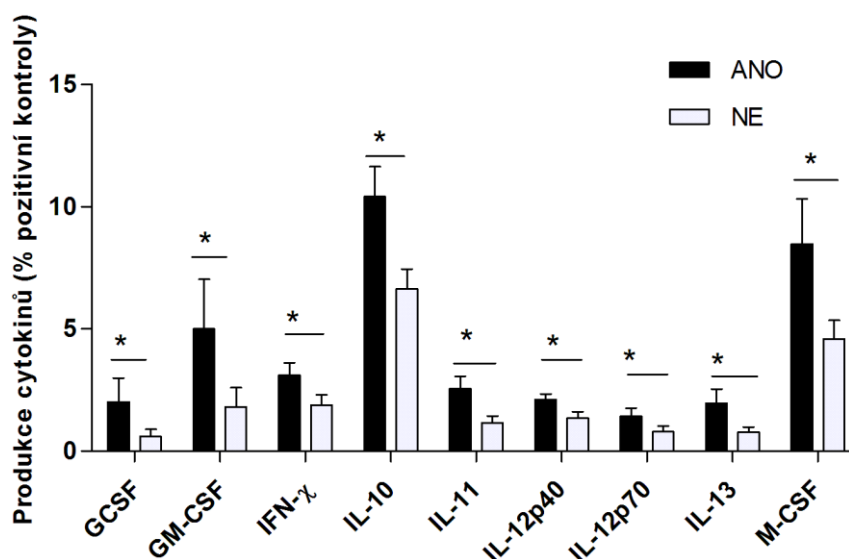


**Obr. 10 Po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní dochází u pacientů po 12 letech ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi Hg, Fe, Ni a Pt.** PBMC (po odstranění adherentních monocytů) byly kultivovány se solemi kovů v koncentraci  $50 \mu\text{l} / 10^6$  buněk na ml. Po 5 dnech bylo k buňkám přidáno  $30 \mu\text{l}$  naředěného  $^3\text{H}$  Thymidinu ( $4 \text{ mBq/ml}$ ) a destička ponechána 4 hodiny v termostatu před dalším zpracováním. Reakce na soli kovů jsou vyjádřeny průměrnými hodnotami stimulačních indexů (SI) + střední chyba průměru. SI je definován jako poměr výsledků získaných kultivací PBMC se solemi kovů a výsledků z nestimulované kultury lymfocytů. V grafu je porovnána změna proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů před 12 lety (černě) a nyní (světle šedě) u pacientů, kterým byly z dutiny ústní odstraněny kovy. Hladina statistické významnosti je vyjádřena \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem.

Z **Obr. 10** je patrné výrazné snížení reakce na rtuť a také byla po 12 letech snížena proliferace lymfocytů po stimulaci solemi železa, niklu a platiny, pokud byly pacientům odstraněny kovové dentální materiály z dutiny ústní.

### 6.3 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi Hg, Ni, Ag nebo TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> u pacientů po odstranění kovů v dutiny ústní

Zajímalo nás, jak se změní imunitní reakce na kovy ve smyslu produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi kovů, pokud byly pacientům kovové dentální materiály z dutiny ústní odebrány. Získaná data jsou prezentována na následujícím grafu (**Obr. 11**).



Obr. 11 Po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní dochází u pacientů ke snížení produkce GCSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-11, IL-12 (p40 i p70), IL-13 a MCSF po stimulaci monocytů solemi rtuti, niklu, stříbra nebo oxidy titanu a zirkonia. Monocyty byly stimulovány solí kovu podle toho, na jaký kov pacient nejvíce reagoval při testu proliferace lymfocytů před 12 lety. Sůl kovu byla použita v koncentraci 50  $\mu$ l/ 10<sup>6</sup> buněk na ml. V supernatantu buněk byla měřena produkce cytokinů multiplexovou metodou RayBio<sup>®</sup>. Produkce cytokinů je vynesena v % pozitivní kontroly + střední chyba průměru. Data v grafu jsou zobrazena pro skupinu pacientů s kovy v dutině ústní (ANO, černě zvýrazněno) a porovnání s pacienty, kterým byly kovy z úst odstraněny (NE, světle šedá). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \* p<0,05. Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney.

Zjistili jsme, že po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní dochází u pacientů ke snížení produkce faktorů podporujících vývoj granulocytů nebo makrofágů (GCSF, GM-CSF, M-CSF), prozánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ , IL-12) a také regulačních (tlumivých) cytokinů (IL-10) v porovnání s pacienty s kovovými dentálními materiály v dutině ústní (**Obr. 11**).

## 6.4 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci PBMC solemi kovů u pacientů s reakcí na rtuť

Na následujícím grafu (**Obr. 12**) jsou shrnuty statistické významnosti rozdílu proliferace lymfocytů před 12 lety a po posledním vyšetření u pacientů, kteří vykazovali před 12 lety nejvyšší reakci (proliferaci lymfocytů vyjádřenou jako stimulační index) na  $\text{HgCl}_2$ .

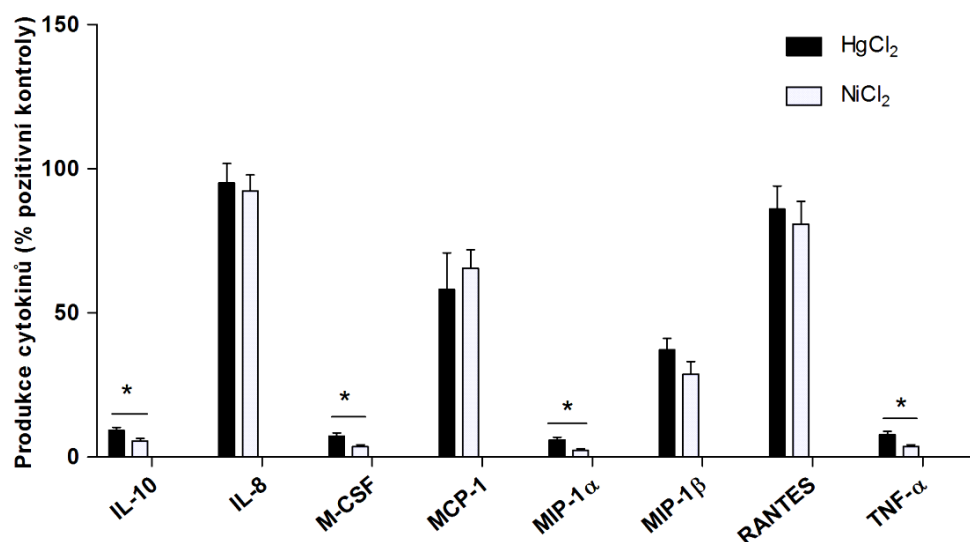


**Obr. 12** U pacientů s reakcí na rtuť (před 12 lety) dochází po 12 letech ke snížení proliferace lymfocytů při stimulaci solemi Hg, Al, Mo a ke zvýšení reakce po stimulaci buněk solí Au. PBMC (po odstranění adherentních monocytů) byly kultivovány se solemi kovů v koncentraci  $50 \mu\text{l} / 10^6$  buněk na ml. Po 5 dnech bylo k buňkám přidáno  $30 \mu\text{l}$  naředěného 3H Thymidinu ( $4\text{mBq/ml}$ ) a destička ponechána 4 hodiny v termostatu před dalším zpracováním. Reakce na soli kovů jsou vyjádřeny průměrnými hodnotami stimulačních indexů (SI) + střední chyba průměru. SI je definován jako poměr výsledků získaných kultivací PBMC se solemi kovů a výsledků z nestimulované kultury lymfocytů. V grafu je porovnána změna proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů před 12 lety (černě) a nyní (světle šedě). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem.

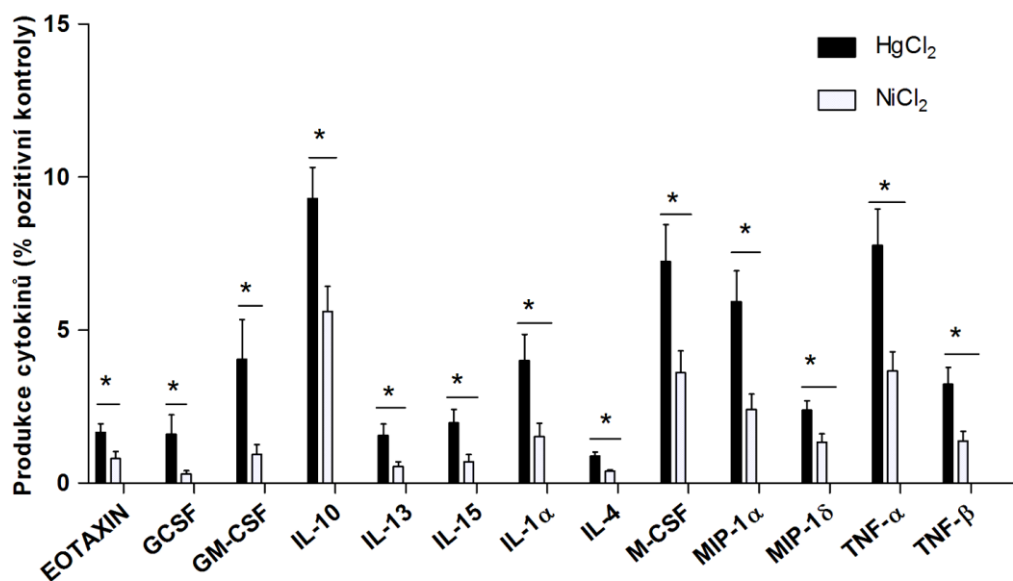
Z **Obr. 12** lze pozorovat, že u pacientů s prokázanou reakcí na rtuť dochází po letech ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci buněk sloučeninami hliníku, molybdenu a zejména je patrné snížení reakce na rtuť. U zlata dochází k signifikantnímu zvýšení proliferace lymfocytů. Pacienti s vyšší reakcí na nikelnaté soli nevykazují po 12 letech změny v proliferaci lymfocytů.

## 6.5 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> nebo NiCl<sub>2</sub>

Hladina produkovaných cytokinů po kultivaci monocytů solemi rtuti a niklu je znázorněna na následujících grafech (Obr. 13 a 14).



Obr. 13 Po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> dochází k signifikantně vyšší tvorbě M-CSF, MIP-1α, IL-10 a TNF-α ve srovnání se stimulací buněk NiCl<sub>2</sub>. V grafu je patrná také zvýšená hladina IL-8, MCP-1 a RANTES u obou skupin. Monocyty byly stimulovány HgCl<sub>2</sub> nebo NiCl<sub>2</sub> v koncentraci 50 μl/ 10<sup>6</sup> buněk na ml. V supernatantu buněk byla měřena produkce cytokinů multiplexovou metodou RayBio®. Produkce cytokinů je vynesena v % pozitivní kontroly + střední chyba průměru. V grafu je porovnán rozdíl v produkci cytokinů po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> (černě) a NiCl<sub>2</sub> (světle šedě). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \* p<0,05. Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney.



Obr. 14 Po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> dochází k signifikantně vyšší tvorbě EOTAXINU, GCSF, GM-CSF, IL-10, IL-13, IL-15, IL-1 $\alpha$ , IL-4, M-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\delta$ , TNF- $\alpha$  a TNF- $\beta$  ve srovnání se stimulací buněk NiCl<sub>2</sub>. Monocyty byly stimulovány HgCl<sub>2</sub> nebo NiCl<sub>2</sub> v koncentraci 50  $\mu$ l/ 10<sup>6</sup> buněk na ml. V supernatantu buněk byla měřena produkce cytokinů multiplexovou metodou RayBio<sup>®</sup>. Produkce cytokinů je vynesena v % pozitivní kontroly + střední chyba průměru. V grafu je porovnán rozdíl v produkci cytokinů po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> (černě) a NiCl<sub>2</sub> (světle šedě). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \* p<0,05. Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney.

Z výše uvedených grafů (Obr. 13 a 14) je zřejmé, že HgCl<sub>2</sub> je mnohem silnějším aktivátorem imunitní odpovědi než NiCl<sub>2</sub> ve smyslu aktivace monocytů a produkce cytokinů.

Prokázali jsme rozdíl v produkci cytokinů po stimulaci monocytů sloučeninami HgCl<sub>2</sub> a NiCl<sub>2</sub>. Vybrané signifikantní cytokiny jsou shrnuty v přehledové tabulce (Tab. 11) včetně jejich úlohy v imunitní odpovědi. Zahrnuti jsou i některé cytokiny se statistickou významností u ostatních skupin pacientů.

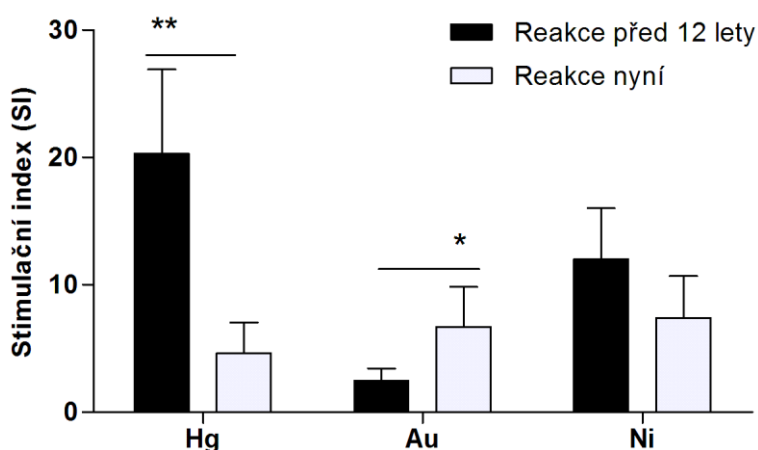
## 6.6 Rozdíly v produkci cytokinů monocyty a proliferace lymfocytů u pacientů s ústním dyskomfortem a atrofií sliznice.

Pacienti s prokázanou přecitlivělostí na kovy pociťují různé subjektivní příznaky. Často se vyskytuje pálení nebo řezání na sliznicích, pachů v ústech nebo nadměrná salivace. Docházet může až k chronické únavě, kožním reakcím nebo bolestem hlavy (Procházková *et al.*, 2004a,b,c). Proto jsme analyzovali rozdíl v imunitní reakci a produkci cytokinů u dvou skupin pacientů podle výskytu ústního dyskomfortu a atrofie sliznice.

Rozdíl v produkci cytokinů a proliferaci lymfocytů nebyl statisticky prokázán.

## 6.7 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci solemi kovů u pacientů s alergií

Signifikantní změny proliferace lymfocytů po 12 letech u pacientů s alergií jsou vyneseny v grafu na **Obr. 15**.



Obr. 15 U pacientů s alergií dochází ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi Hg a ke zvýšení reakce účinkem Au. PBMC (po odstranění adherentních monocytů) byly kultivovány se solemi kovů v koncentraci 50  $\mu\text{l}/10^6$  buněk na ml. Po 5 dnech bylo k buňkám přidáno 30  $\mu\text{l}$  naředěného  $^3\text{H}$  Thymidinu (4mBq/ml) a destička ponechána 4 hodiny v termostatu před dalším zpracováním. Reakce na soli kovů jsou vyjádřeny průměrnými hodnotami stimulačních indexů (SI) + střední chyba průměru. SI je definován jako poměr získaných kultur PBMC se solemi kovů a výsledků z nestimulované kultury lymfocytů. V grafu je porovnávána změna proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů před 12 lety (černě) a nyní (světle šedě). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem.

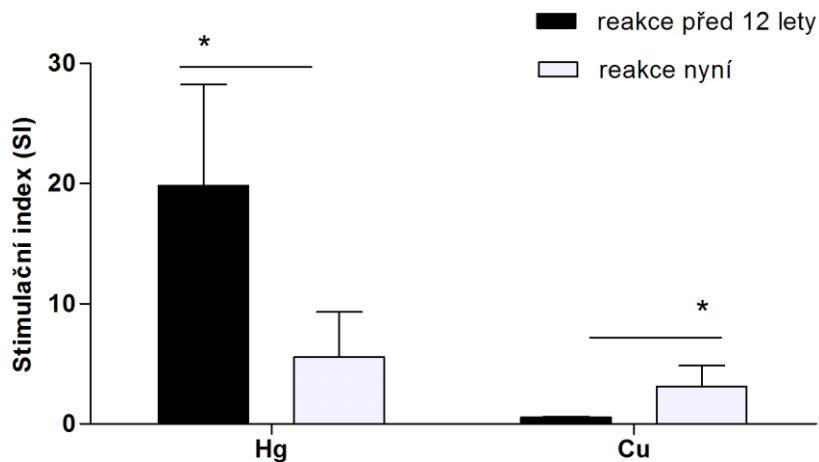


Na **Obr. 15** lze pozorovat, že zatímco u rtuti bylo pozorováno snížení proliferace lymfocytů, sůl zlata vyvolala po 12 letech opačný účinek. U pacientů po letech často dochází ke snížení imunitní odpovědi na kov s nejvyšší reakcí (stimulačním indexem) před lety, ale objevují se i změny proliferace lymfocytů po kultivaci s kovy, na které pacient dříve nereagoval.

V produkci cytokinů monocyty po kultivaci se solemi kovů nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů s alergií a pacientů, u kterých nebyla alergie zjištěna.

## **6.8 Rozdíl v úrovni proliferace lymfocytů před 12 lety a nyní při stimulaci solemi kovů u pacientů s negativní rodinnou anamnézou**

U pacientů s přecitlivělostí na kovy byla objevena zvýšená frekvence HLA-B37, HLA-B47 a HLA-DR4 a naopak v menší míře byl zastoupen HLA-DR7 (Saito *et al.*, 1996; Procházková *et al.*, 2000). Porovnávali jsme tedy proliferaci lymfocytů po kultivaci se solemi kovů u pacientů, rozlišených do dvou skupin podle pozitivní/negativní rodinné anamnézy (RA). Pacienti s pozitivní RA nevykazovali statisticky významné změny v proliferačních testech po stimulaci PBMC (po odstranění adherentních monocytů) solemi kovů. Vyhodnocená data pro pacienty s negativní RA jsou znázorněna na následujícím grafu (**Obr. 16**).

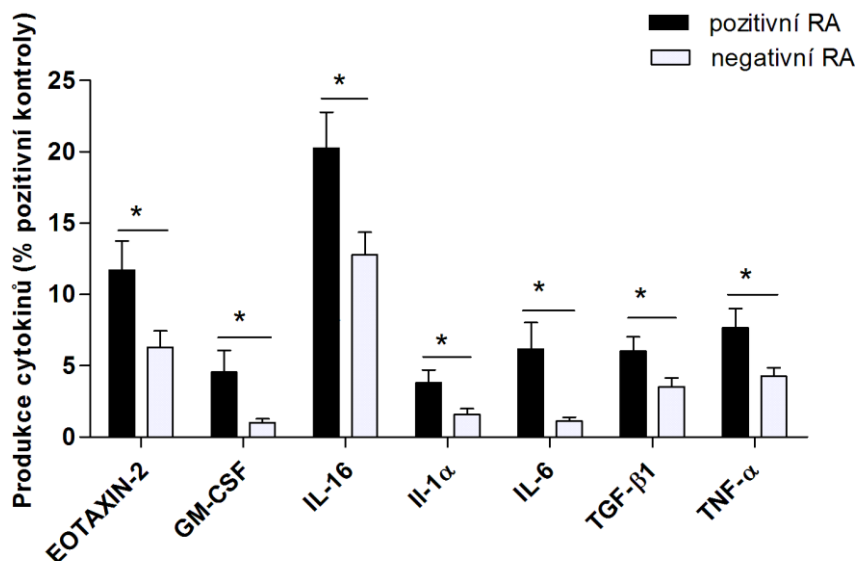


Obr. 16 U pacientů s negativní rodinnou anamnézou dochází po 12 letech ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi Hg a ke zvýšení reakce účinkem Cu. PBMC (po odstranění adherentních monocytů) byly kultivovány se solemi kovů v koncentraci 50  $\mu\text{l}/10^6$  buněk na ml. Po 5 dnech bylo k buňkám přidáno 30  $\mu\text{l}$  naředěného  $^3\text{H}$  Thymidinu (4 mBq/ml) a destička ponechána 4 hodiny v termostatu před dalším zpracováním. Reakce na soli kovů jsou vyjádřeny průměrnými hodnotami stimulačních indexů (SI) + střední chyba průměru. SI je definován jako poměr výsledků získaných kultivací PBMC se solemi kovů a výsledků z nestimulované kultury lymfocytů. V grafu je porovnávána změna proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů před 12 lety (černě) a nyní (světle šedě). Hladina statistické významnosti je vyjádřena \*  $p < 0,05$ . Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým jednovýběrovým Wilcoxonovým testem.

Z Obr. 16 je patrné snížení reakce na rtuť po 12 letech u pacientů s negativní RA, naproti tomu dochází k signifikantnímu zvýšení reakce na měď.

## 6.9 Porovnání produkce cytokinů po stimulaci monocytů solemi Hg, Ni, Ag nebo TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> u pacientů s pozitivní/negativní rodinnou anamnézou

Ikdyž proliferace lymfocytů po kultivaci se solemi kovů nevykazovala signifikantní změny u pacientů s pozitivní RA, bylo vhodné porovnat míru produkce cytokinů monocytů po stimulaci kovy. Produkce cytokinů (vyjádřená v % pozitivní kontroly) je znázorněna na Obr. 17.



Obr. 17 U pacientů s negativní rodinnou anamnézou dochází k nižší produkci EOTAXINU-2, GM-CSF, IL-16, IL-1 $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 a TNF- $\alpha$  po stimulaci monocytů solemi kovů ve srovnání s pacienty s pozitivní RA. Monocyty byly stimulovány HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOAg, TiO<sub>2</sub> nebo ZrO<sub>2</sub> (podle toho, na jaký kov pacient nejvíce reagoval při testu proliferace lymfocytů před 12 lety) v koncentraci 50  $\mu$ l/ 10<sup>6</sup> buněk na ml. V supernatantu buněk byla měřena produkce cytokinů multiplexovou metodou RayBio®. Produkce cytokinů je vynesena v % pozitivní kontroly + střední chyba průměru. Hodnoty produkce cytokinů u pacientů s pozitivní RA jsou znázorněny černými sloupci, u pacientů s negativní RA světle šedě. Hladina statistické významnosti je vyjádřena \* p<0,05. Statistické zpracování bylo provedeno neparametrickým testem Mann-Whitney.

Na Obr. 17 je zřejmé snížení produkce cytokinů monocytů u pacientů s negativní RA. K signifikantnímu snížení dochází u EOTAXINU-2, GM-CSF, IL-16, IL-1 $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 a TNF- $\alpha$ . Přehled vybraných cytokinů, u kterých byla prokázána signifikantní změna v rámci skupin pacientů, je znázorněn v následující tabulce Tab. 11.

Tab. 11 **Přehled cytokinů produkovaných po stimulaci monocytů solemi kovů se zjištěnou statistickou významností.** Tabulka udává shrnutí vybraných cytokinů se statistickou významností u všech analyzovaných skupin pacientů.

<b>Cytokin</b>	<b>Funkce</b>
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů, aktivace neutrofilů a uvolnění matrixmetaloproteáz (Kobayashi <i>et al.</i> , 2009).
MIP-1 $\alpha$	Prozánětlivý chemokin, atrahuje monocyty i T buňky, po infekci produkován např. DC (Hu <i>et al.</i> , 2012).
IFN- $\gamma$	Zánětlivý cytokin, produkován Th1 buňkami (přehledně v Trinchieri, 1994).
IL-1 $\alpha$	Prozánětlivý cytokin, produkován různými buňkami, např. endoteliálními buňkami hladkého svalu nebo epiteliálními buňkami (Rao <i>et al.</i> , 2007).
IL-4	Produkován Th2 buňkami a granulocyty (bazofily, žírné buňky) (přehledně v Mosser and Edwards, 2008); aktivace B buněk a přesmyk na tvorbu protilátek IgE (přehledně v Stewart and Sally, 2010).
IL-6	Produkován makrofágy, důležitý pro diferenciaci a aktivaci Th17 buněk (přehledně v Mosser and Edwards, 2008).
IL-10	Produkován Tregs, inhibiční cytokin, může být produkován také regulačními makrofágy (přehledně v Mosser and Edwards, 2008).
IL-11	Růstový faktor, reguluje diferenciaci makrofágů, produkován různými buňkami, např. fibroblasty (Putoczki and Ernst, 2010).
IL-12	Aktivace zánětlivé Th1 buněčné odpovědi; produkován DC, makrofágy (přehledně v Trinchieri, 1994).
IL-13	Produkován Th2 buňkami (přehledně v Stewart and Sally, 2010).
IL-15	Produkován monocyty, makrofágy, DC a např. epiteliálními buňkami. U makrofágů zvyšuje vysoká hladina IL-15 produkci TNF- $\alpha$ a IL-6, při nízké hladině IL-15 se zvyšuje produkce IL-10; u monocytů podporuje produkci IL-8 a chemotaktických faktorů. Je důležitý pro diferenciaci NK buněk, které po stimulaci IL-15 produkují IFN- $\gamma$ (přehledně v Perera <i>et al.</i> , 2012).
IL-16	Prozánětlivý cytokin, který stimuluje monocyty a makrofágy k sekreci IL-6, IL-15 a TNF- $\alpha$ (přehledně v Deng and Shi, 2006).
TGF- $\beta$ 1	Negativní růstový faktor, produkován např. Tregs k polacení (regulaci) imunitní odpovědi (přehledně v Stewart and Sally, 2010).
TNF- $\alpha$	Produkován monocyty, makrofágy, podpora zánětlivé imunitní odpovědi (Schildberger <i>et al.</i> , 2013).

## 6.10 Vzájemný vztah mezi měřenými cytokiny a jejich korelace s kovy

Pomocí Spearmanova korelačního koeficientu byl analyzován vztah mezi jednotlivými měřeními cytokiny a také závislost produkce cytokinů a reakce na kovy (udána jako stimulační index), které byly použity ke stimulaci PBMC. Korelační koeficient je definován v rozmezí hodnot -1 až +1, kde hodnota -1 udává nepřímou závislost a hodnota +1 závislost přímou. Korelační matice pro cytokiny a kovy jsou zobrazeny v **Tab. 14** a **15** (viz **Přílohy**) a na následujících tabulkách (**Tab. 12** a **13**) je znázorněn korelační vztah mezi vybranými cytokiny a mezi kovem a cytokiny.

**Tab. 12 Přehled zjištěných závislostí mezi produkcí vybraných cytokinů po stimulaci monocytů solemi kovů.** Monocyty byly stimulovány HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOAg, TiO<sub>2</sub> nebo ZrO<sub>2</sub> po dobu 5 dní a produkce cytokinů byla měřena metodou RayBio®. V tabulce jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu. Barevně jsou vyznačeny p-hodnoty; červeně je označena statistická významnost na hladině p<0,001, zeleně p<0,01, žlutě p<0,05 a modře bez statistické významnosti.

	IFN-γ	IL-12p70	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12p40	IL-1α	IL-1β	IL-4	IL-6	MIP-1δ	TGF-β1
IFN-γ	1,000	0,912	0,553	0,864	0,774	0,913	0,810	0,916	0,916	0,794	0,729	0,862
IL-12p70	0,912	1,000	0,576	0,867	0,887	0,965	0,866	0,878	0,731	0,809	0,807	0,856
IL-8	0,553	0,576	1,000	0,583	0,790	0,655	0,553	0,499	0,426	0,754	0,533	0,336
IL-10	0,864	0,867	0,583	1,000	0,816	0,904	0,752	0,825	0,789	0,714	0,891	0,843
IL-11	0,774	0,887	0,790	0,816	1,000	0,929	0,774	0,803	0,654	0,817	0,662	0,767
IL-12p40	0,913	0,965	0,655	0,904	0,929	1,000	0,859	0,924	0,776	0,826	0,813	0,876
IL-1α	0,810	0,866	0,553	0,752	0,774	0,859	1,000	0,839	0,664	0,808	0,804	0,771
IL-1β	0,916	0,878	0,499	0,825	0,803	0,924	0,839	1,000	0,785	0,695	0,761	0,887
IL-4	0,916	0,731	0,426	0,789	0,654	0,776	0,664	0,785	1,000	0,606	0,687	0,824
IL-6	0,794	0,809	0,754	0,714	0,817	0,826	0,808	0,695	0,606	1,000	0,676	0,608
MIP-1δ	0,729	0,807	0,533	0,891	0,662	0,813	0,804	0,761	0,687	0,676	1,000	0,757
TGF-β1	0,862	0,856	0,336	0,843	0,767	0,876	0,771	0,887	0,824	0,608	0,757	1,000

V **Tab. 12** je patrný velmi signifikantní vztah mezi mnoha cytokiny, a to až na statistické hladině významnosti p<0,001. Prokázali jsme závislost hladin cytokinů IL-12 a IFN-γ, které jsou hlavními mediátory zánětlivé reakce oddálené přecitlivělosti, což dokládají studie Schnorr a kol. (2012) a Trinchieri (1974). V rozvoji zánětu se také uplatňuje IL-1β (Böcker *et al.*, 2001) a pomocí Spearmanova korelačního koeficientu jsme

zjistili, že jeho produkce ovlivňuje hladinu mnoha dalších cytokinů, například IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, a TGF- $\beta$ 1.

Také nás zajímalo, jaká je korelace mezi cytokiny produkovanými monocyty a zjištěnou reakcí na kovy (stimulačním indexem), které byly použity ke stimulaci PBMC. Vzájemná závislost pro měď a nikl je zobrazena v tabulce **Tab. 13**.

**Tab. 13 Přehled zjištěných závislostí mezi produkcí vybraných cytokinů po stimulaci monocytů a proliferací lymfocytů po stimulaci solí mědi.** Monocyty byly stimulovány HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOAg, TiO<sub>2</sub> nebo ZrO<sub>2</sub> a produkce cytokinů byla měřena metodou RayBio<sup>®</sup>. PBMC (po odstranění adherentních monocytů) byly kultivovány po dobu 5 dní se solí Cu a následně měřena proliferace lymfocytů inkorporací <sup>3</sup>H Thymidinu (MELISA<sup>®</sup>). V tabulce jsou uvedeny hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu. Barevně jsou vyznačeny p-hodnoty; zeleně je označena statistická významnost na hladině p<0,01, žlutě p<0,05 a modře bez statistické významnosti.

	IFN- $\gamma$	IL-12p70	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-7	IL-13	IL-10	IL-11	IL-12p40	M-CSF	MIP-1 $\delta$
Cu	0,679	0,701	0,679	0,754	0,673	0,664	0,688	0,534	0,684	0,692	0,622

Nebyla prokázána žádná korelace mezi proliferací lymfocytů po stimulaci HgCl<sub>2</sub> a produkcí cytokinů monocytů po stimulaci HgCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>COOAg, TiO<sub>2</sub> nebo ZrO<sub>2</sub>. Statisticky významnější bylo porovnání produkce cytokinů monocytů a proliferace lymfocytů po stimulaci PBMC solí mědi. Přímá závislost mezi hladinou proliferace lymfocytů po kultivaci se solí mědi a produkcí cytokinů monocytů byla významná u zánětlivých cytokinů (zejména IFN- $\gamma$ , IL-12), které se účastní rozvoje Th1 buněčné odpovědi, a mimo jiné také u IL-4 a IL-13 (viz **Tab. 13**), které podporují Th2 buněčnou odpověď a uplatňují se v patogenezi alergie. Kov působí po vazbě na bílkovinu (jako haptén) na organismus zřejmě více směry a dochází k produkci mnoha cytokinů, jejichž hladiny jsou často ovlivňovány, jak jsme zjistili z korelačních matic.

## 7 Diskuze

V současné medicíně se uplatňuje stále se zvyšující počet materiálů. Biomateriály interagují s biologickým systémem a vyznačují se schopností vyvolat odpovídající imunitní odpověď organismu. Důležitou vlastností je biokompatibilita, míra snášenlivosti materiálu v biologickém systému, která je ovlivňována zejména uvolňováním kovových iontů z povrchu materiálu vlivem rozpustnosti materiálu a korozivními vlastnostmi (Williams, 1987). Materiály mohou být také bioaktivní a ovlivňovat metabolismus a funkci okolních buněk. Využívá se potahování povrchu biomateriálu za účelem dosažení lepší snášenlivosti organismu (Albrektsson and Johansson, 2001).

Nežádoucí účinky dentálních materiálů jsou popisovány jako vznik alergické reakce IV. typu oddálené přecitlivělosti. Dochází k narušení obranyschopnosti organismu, tkáně jsou často poškozeny chronickým zánětem (přehledně ve Forte *et al.*, 2008; Rahilly and Price, 2003), dochází k produkci cytokinů, zvýšené cévní permeabilitě a v místě reakce se aktivuje také antigenně nespecifická složka imunity. Imunitní reakce je plně dosažena po 48 hodinách a její hladina je udržena několik dní (Alexader and Curtis, 1979).

V diplomové práci byla sledována proliferace lymfocytů a produkce cytokinů monocyty po stimulaci solemi kovů, které jsou složkami dentálních materiálů. Test proliferace lymfocytů *in vitro* byl modifikován pro průkaz reakce na kovové sloučeniny přítomné v dentálních materiálech a patentován ve Švédsku pod názvem MELISA (memory lymphocyte immuno-stimulation assay). Tento test byl původně vyvinut pro detekci epitopů léčiv a jiných chemických sloučenin nízké molekulové hmotnosti (Stejskal, 1989; Stejskal *et al.*, 1994).

Zjistili jsme, že pokud byly pacientům odstraněny kovy z dutiny ústní, docházelo po 12 letech k signifikantnímu snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi Hg, Fe, Ni a Pt (viz **Obr. 10**). U pacientů, kteří vykazovali před 12 lety přecitlivělost na rtuť, bylo po 12 letech pozorováno statisticky významné snížení stimulačního indexu (proliferace lymfocytů) po kultivaci PBMC s HgCl<sub>2</sub>. Souvislost by mohla být v přítomnosti kovů v dutině ústní. Některým pacientům byly kovové dentální materiály odstraněny, což by mohlo být faktorem, který se podílel na zlepšení stavu. Snížení stimulačního indexu u pacientů se zvýšenou přecitlivělostí na rtuť před 12 lety bylo objeveno i u hliníku a molybdenu. Jisté zhoršení bylo zaznamenáno zvýšenou reakcí na sůl zlata (**Obr. 12**).

Patrné byly i změny proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů po 12 letech u pacientů s negativní rodinnou anamnézou. Pacienti s negativní RA vykazovali po 12 letech

sníženou reakci (vyjádřenou jako stimulační index) na rtuť, oproti tomu byla signifikantně zvýšena reakce na sůl mědi (**Obr. 16**). U pacientů s alergií dochází po 12 letech ke snížení proliferace lymfocytů po stimulaci  $\text{HgCl}_2$  a ke zvýšení reakce na sůl zlata (viz **Obr. 15**), což bylo patrné i u pacientů s prokázanou přecitlivělostí na rtuť. Pacienti se zjištěnou přecitlivělostí na nikelnaté soli (před 12 lety) nevykazují změny v proliferaci lymfocytů.

Přecitlivělost na nikl (alergická kontaktní dermatitida) je popisována jako reakce oddálené přecitlivělosti s možnou úlohou NK buněk, které reagují na přítomnost niklu produkcí  $\text{IFN-}\gamma$  (Kim *et al.*, 2009), jehož vysoká hladina je typická pro reakci oddálené přecitlivělosti (Schnorr *et al.*, 2012). Aby docházelo k produkci  $\text{IFN-}\gamma$  T a NK buňkami, je důležitý jejich kontakt s buňkami prezentujícími antigen (hlavně makrofágy a dendritické buňky), které po aktivaci produkují IL-12. Interleukin IL-12 stimuluje T a NK buňky k produkci  $\text{IFN-}\gamma$  (přehledně v Trinchieri, 1994). V naší práci jsme prokázali, že po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní dochází u pacientů ke snížení produkce IL-12 a  $\text{IFN-}\gamma$  po stimulaci monocytů solemi kovů (**Obr. 11**). Naměřená hladina  $\text{IFN-}\gamma$  vypovídá zřejmě o kontaminaci monocytů T nebo NK buňkami.

V této pilotní studii jsme také prokázali, že po stimulaci monocytů  $\text{HgCl}_2$  dochází k signifikantně vyšší produkci GCSF, GM-CSF, IL-10, IL-15, M-CSF,  $\text{MIP-1}\alpha$ ,  $\text{MIP-1}\delta$  a  $\text{TNF-}\alpha$  v porovnání s  $\text{NiCl}_2$  (viz **Obr. 14**). Podle našich výsledků se rtuť jeví jako výraznější aktivátor imunitní odpovědi ve srovnání s niklem. Je patrné, že účinkem kovu na monocyty (adherentní buňky) je dosaženo rozvoje zánětu. Nejvyšší hladiny cytokinů produkovaných po stimulaci monocytů solemi rtuti nebo niklu byly naměřeny u IL-8, MCP-1 a RANTES (**Obr. 13**), které se vyznačují chemotaktickou aktivitou a atrahují buňky imunitního systému do místa infekce, čímž dochází k prohloubení zánětu.

Pacienti s odstraněnými kovy z dutiny ústní vykazovali nižší hladiny růstových faktorů granulocytů nebo makrofágů (monocytů) GCSF, GM-CSF a M-CSF v porovnání s pacienty s výskytem kovů v dutině ústní (**Obr. 11**). Bylo tedy pozorováno snížení produkce faktorů, ovlivňujících proliferaci a diferenciaci makrofágů (monocytů) a granulocytů a z toho plynoucí snížení aktivace imunitní odpovědi. K aktivaci T buněk je totiž nutný kontakt s buňkami prezentujícími antigen (například makrofágy nebo dendritické buňky). WALSH a kol. (1990) také prokázali, že GM-CSF podporuje adhezenci eozinofilů na sklo s nanesenou vrstvou plazmy a na lidské endoteliální buňky. U pacientů s odstraněnými kovy z dutiny ústní byla dále snížena hladina IL-10 a IL-11, což



jen dokládá potlačení celkové imunitní odpovědi a produkce cytokinů, pokud byly odstraněny kovové dentální materiály.

Bylo zjištěno, že nikl stimuluje produkci IL-10 po kultivaci s PBMC (Minang *et al.*, 2006b). V našich výsledcích byla hladina IL-10 signifikantně zvýšena (viz **Obr. 14**) po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> ve srovnání s NiCl<sub>2</sub>. Pokud byly pacientům odebrány kovy z dutiny ústní, byla zjištěna snížená produkce IL-10 (**Obr. 11**). Interleukin IL-10 je důležitým regulačním cytokinem, je produkován buňkami Tregs a uplatňuje se při potlačení imunitní odpovědi. V Mosser and Edwards. (2008) bylo popsáno, že IL-10 produkují také tzv. regulační makrofágy.

Prokázali jsme, že po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> dochází k signifikantně vyšší produkci IL-15 ve srovnání se stimulací NiCl<sub>2</sub> (viz **Obr. 14**). I po letech je rtuť podle našich zjištění silnějším aktivátorem imunitní odpovědi, než nikl. Studií Perera a kol. (2012) bylo popsáno, že IL-15 je důležitým faktorem pro diferenciaci a aktivaci NK buněk, které po stimulaci IL-15 produkují IFN- $\gamma$ .

Při pokusech s makrofágovou buněčnou linií byla objevena snížená produkce IL-12p70 po stimulaci solemi rtuti, kobaltu a niklu. Zvýšení produkce sTNF-RI bylo pozorováno u rtuti, chromu, kobaltu a palladia. Po kultivaci makrofágů s chromem se zvýšila produkce RANTES a IL-8 a snížila se hladina M-CSF a IL-1 $\alpha$ . Produkce M-CSF byla snížena i po stimulaci buněk kobaltem a niklem. Palladium zvyšovalo produkci TGF- $\beta$  buňkami makrofágové linie. Také byla objevena zvýšená produkce IL-10 po stimulaci buněk titanem, chromem a niklem (Venclíková *et al.*, 2013). V naší práci byly nejvyšší hladiny cytokinů produkováných po stimulaci monocytů solemi rtuti nebo niklu naměřeny u IL-8, MCP-1 a RANTES (**Obr. 13**), což u chromu dokládá uvedená studie Venclíkové a kol. (2013), kdy po kultivaci makrofágů se solí chromu docházelo ke zvýšené produkci IL-8 a RANTES.

Významná je také genetická predispozice při intoleranci kovů. U pacientů s přecitlivělostí na kovy byla objevena zvýšená frekvence HLA-B37, HLA-B47 a HLA-DR4 a naopak v menší míře byl zastoupen HLA-DR7 (Saito *et al.*, 1996; Procházková *et al.*, 2000). Proto jsme pacienty rozdělili do skupin s pozitivní, resp. negativní rodinnou anamnézou. Prokázali jsme signifikantní změny v produkci cytokinů. U pacientů s negativní RA byly naměřeny nižší hladiny GM-CSF, IL-16, IL-1 $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 a TNF- $\alpha$  ve srovnání s pacienty s pozitivní RA (**Obr. 17**). Z výsledků je patrné snížení produkce zánětlivých cytokinů (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-16 a TNF- $\alpha$ ).

Po kultivaci niklu s PBMC byla také zjištěna zvýšená produkce cytokinů IL-4, IL-13 a IFN- $\gamma$  (Minang *et al.*, 2006b). Interleukiny IL-4 a IL-13 jsou produkovány Th2 buňkami a uplatňují se v patogenezi alergie, zejména stimulaci B buněk k produkci protilátek třídy IgE (přehledně v Stewart and Sally, 2010). Prokázali jsme snížení produkce IL-13 a IFN- $\gamma$  po 12 letech u pacientů s odebranými kovy z dutiny ústní (**Obr. 11**). Tyto cytokiny byly detekovány zřejmě vlivem kontaminace monocytů T buňkami.

Převažující buněčnou populací při nežádoucí reakci na kovové dentální materiály jsou CD4+ T buňky, které se vyznačují produkcí cytokinů IL-17, IL-22 a IFN- $\gamma$  (Dyring-Andersen *et al.*, 2013). Toto tvrzení dokládají naše výsledky, kdy u pacientů s odstraněnými kovy z dutiny ústní jsme zjistili sníženou produkci IFN- $\gamma$  (a také IL-12) po kultivaci monocytů solemi rtuti, niklu, stříbra nebo TiO<sub>2</sub> a ZrO<sub>2</sub> (**Obr. 11**), která je dána zřejmě přítomností T nebo NK buněk, které nebyly dostatečně odmyty během separace monocytů.

V patogenezi kontaktní dermatitidy má zřejmě velkou úlohu populace Th17 buněk. Pokud je přítomen IFN- $\gamma$  keratinocyty jsou stimulovány k uvolnění molekul CXCL8 (IL-8), IL-6 a HBD-2. Dochází ke zvýšené expresi molekuly ICAM-1 na povrchu keratinocytů, která je důležitá k jejich interakci s T buňkami a k vyvolání apoptózy keratinocytů (Pennino *et al.*, 2010). Vzhledem k hojným studiím o úloze buněčné populaci Th17 a zánětlivého interleukinu IL-17, který produkují, by bylo vhodné se dále zaměřit na testování produkce IL-17 po stimulaci PBMC solemi kovů a jeho roli v reakci na kovové materiály.

Ukazuje se, že preferenčně jsou sloučeninami HgCl<sub>2</sub> vázanými na bílkovinu aktivovány CD4+ T buňky, jejichž proliferace a aktivace dosahuje maximální hodnoty v 6. dni kultivace. K plné aktivaci T buněk je důležitá kooperace s CD14+ buňkami (LOFTENIUS, EKSTRAND and MÖLLER, 1997). Proto nás zajímalo sledovat aktivaci a produkci cytokinů monocytů po působení solemi kovů. V budoucnu by bylo potřeba provést separaci monocytů podle jejich povrchového markeru CD14 (koreceptor TLR4) a tím docílit odstranění T buněk ze suspenze monocytů.

Již z pokusů Venclíkové a kol. (2013) na makrofágové buněčné linii byla zjištěna signifikantní změna produkce cytokinů po stimulaci solemi kovů, a proto jsme se zaměřili na imunitní reakci monocytů po kultivaci se solemi kovů přítomných v dentálních materiálech. Monocyty jsou klíčové buňky imunitního systému, které se jako buňky prezentující antigen, zejména po přeměně v tkáních v makrofágy, přímo podílejí na aktivaci imunitní odpovědi a jejich stimulace je tedy zásadním faktorem při rozvoji

nežádoucí reakce na dentální materiály. V této studii by bylo vhodné dále pokračovat a zaměřit se na izolaci dendritických buněk (z periferních monocytů) a sledovat produkci cytokinů po stimulaci solemi kovů. Dalším budoucím postupem by mohlo být porovnání produkce cytokinů monocytů/dendritickými buňkami s nestimulovanými buňkami pacientů. U pacientů jsme ovšem často měli problém s nízkým počtem adherentních buněk, proto jsme testování nestimulovaných buněk neprováděli.

Při přecitlivělosti na kovy v dentálních materiálech podle našich výsledků dochází k produkci širokého spektra cytokinů. Nežádoucí reakce jsou označovány jako reakce oddálené přecitlivělosti, pro které jsou důležitými mediátory IFN- $\gamma$  a IL-12, jejichž hladiny jsme objevili signifikantně snížené u pacientů s odstraněnými dentálními materiály. Po stimulaci monocytů se solemi kovů dochází k produkci mnoha cytokinů, například růstových faktorů pro kolonie monocytů (makrofágů) a granulocytů nebo chemokinů, které atrahují buňky imunitního systému do místa zánětu. Výsledkem je aktivace imunitních buněk a stimulace specifických i nespecifických mechanismů imunity.

Monocyty (makrofágy) jsou tedy důležitými buňkami imunitního systému. Jejich kooperace s T buňkami je klíčovým faktorem pro rozvoj imunitní odpovědi při přecitlivělosti na kovové dentální materiály.

## 8 Souhrn

Bylo zjištěno následující:

- 1) Pokud byly pacientům odstraněny kovy z dutiny ústní, docházelo po 12 letech k signifikantnímu snížení proliferace lymfocytů po stimulaci solemi Hg, Fe, Ni a Pt. U pacientů, kteří vykazovali před 12 lety zvýšenou reakci na rtuť, bylo po 12 letech pozorováno statisticky významné snížení hodnoty stimulačního indexu po kultivaci PBMC s HgCl<sub>2</sub>. Snížení stimulačního indexu bylo objeveno i u hliníku a molybdenu. Byla objevena zvýšená přecitlivělost na zlato u pacientů, kteří před 12 lety vykazovali nejvyšší reakci na HgCl<sub>2</sub> a také u pacientů s alergií.

U pacientů s alergií bylo po 12 letech pozorováno také snížení proliferace lymfocytů po stimulaci HgCl<sub>2</sub>.

Pacienti s přecitlivělostí na nikelnaté soli nevykazovali po 12 letech změny v proliferaci lymfocytů.

- 2) Po odstranění kovových dentálních materiálů z dutiny ústní docházelo u pacientů ke snížení produkce IL-12 po stimulaci monocytů solemi kovů přítomnými v dentálních materiálech.

Pacienti s odstraněnými kovy z dutiny ústní vykazovali také nižší hladiny růstových faktorů granulocytů nebo makrofágů (monocytů) GCSF, GM-CSF a M-CSF v porovnání s pacienty s výskytem kovů v dutině ústní. Bylo tedy pozorováno snížení faktorů, ovlivňujících proliferaci a diferenciaci makrofágů (monocytů) a granulocytů.

I po letech je rtuť podle našich zjištění silným aktivátorem imunitní odpovědi. Po stimulaci monocytů HgCl<sub>2</sub> docházelo k signifikantně vyšší tvorbě GCSF, GM-CSF, IL-10, IL-15, M-CSF, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\delta$  a TNF- $\alpha$  ve srovnání se stimulací monocytů NiCl<sub>2</sub>.

U pacientů s negativní RA byly naměřeny nižší hladiny zánětlivých cytokinů (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-16 a TNF- $\alpha$ ).

## 9 Seznam použité literatury

**Abdallah, H. I.; Balsara, R. K.; O’Riordan, A. C.** Pacemaker contact sensitivity: clinical recognition and management. *Annals of Thoracic Surgery*, 1994, 57 (4), 1017–1018.

**Akagawa, Y.; Abe, Y.** Titanium: the ultimate solution or an evolutionary step? *Int J Prosthodont.* 2003, 16 (Suppl.): 28–29, discussion 47–51.

**Albrektsson, T.; Johansson, C.** Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001, 10 (Suppl 2), 96-101.

**Alexander, J.; Curtis, J.** Development of delayed hypersensitivity responses in *Mycobacterium lepraemurium* infections in resistant and susceptible strains of mice. *Immunology.* 1979, 36 (3), 563-567.

**AOYAGI, H.; KATAGIRI, M.** Long-term Effects of Ag-containing Alloys on Mucous Tissue Present in Biopsy Samples. *Dent Mater J.* 2004, 23 (3), 340–347.

**Ayehunie, S.; Snell, M.; Child, M.; Klausner, M.** A plasmacytoid dendritic cell (CD123+/CD11c-) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals. *Toxicology* 2009, 264 (1-2), 1–9.

**BACON, K. B.; FLORES-ROMO, L.; AUBRY, J.-P.; WELLS, T. N. C.; POWER, C. A.** Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers. *Immunology.* 1994, 82 (3), 473–481.

**Bangert, C.; Friedl, J.; Sary, G.; Stingl, G.; Kopp, T.** Immunopathologic Features of Allergic Contact Dermatitis in Humans: Participation of Plasmacytoid Dendritic Cells in the Pathogenesis of the Disease? *J Invest Dermatol.* 2003, 121 (6), 1409–1418.

**Bártová, J.; Procházková, J.; Krátká, Z.; Benetková, K.; Venclíková, Z.; Šterzl, I.** Dental amalgam as one of the risk factors in autoimmune diseases. *Neuroendocrinol. Lett.* 2003, 24 (1-2), 65–67.

**Bártová, J.; Krátká, Z.; Benetková, K.; Procházková, J.; Šterzl, I.** Dental amalgam as a risk factor in autoimmune disease. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003, 24 (1-2), 65-67.

**Bělohávková, S.; Bělohávek, J.; Podzimek, Š.** Alergická kontaktní dermatitida jako reakce na nitinol po katetrizačním uzávěru perzistujícího foramen ovale Amplatzerovým okludérem- kazuistika. *Alergie* 2011, 2, 136–141.

- Björkman, L.; Lundekvam, B. F.; Laegreid, T.; Bertelsen, B. I.; Morild, I.; Lilleng, P.; Lind, B.; Palm, B.; Vahter, M.** Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. *Environ Health* 2007, 6, 30.
- Böcker, U.; Sirenko, O. I.; Morris, J. S.; Sartor, R. B.; Singer, M. V.; Haskill, J. S.; Watson, J. M.** Expression and localization of IL-1 $\beta$  mRNA is interrelated with cytoskeletal rearrangement in monocytes stimulated by adherence: A light microscopy *in situ* hybridization study. *Immunol Cell Biol.* 2001, 79 (5), 444–453.
- Boislève, F.; Kerdine-Römer, S.; Rougier-Larzat, N.; Pallardy, M.** Nickel and DNCB Induce CCR7 Expression on Human Dendritic Cells Through Different Signalling Pathways: Role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol.* 2004, 123 (3), 494–502.
- Brandão, M. H.; Gontijo, B.** Contact sensitivity to metals (chromium, cobalt and nickel) in childhood. *An Bras Dermatol.* 2012, 87 (2), 269–276.
- Cavani, A.; Nasorri, F.; Ottaviani, C.; Sebastiani, S.; De Pità, O.; Girolomoni, G.** Human CD25+ Regulatory T Cells Maintain Immune Tolerance to Nickel in Healthy, Nonallergic Individuals. *J Immunol.* 2003, 171 (11), 5760–5768.
- Cavani, A.; Nasorri, F.; Prezzi, C.; Sebastiani, S.; Albanesi, C.; Girolomoni, G.** Human CD4+ T Lymphocytes with Remarkable Regulatory Functions on Dendritic Cells and Nickel-Specific Th1 Immune Responses. *J. Invest. Dermatol.* 2000, 114 (2), 295–302.
- Clarkson, T. W.; Magos, L.; Myers, G. J.** The Toxicology of Mercury - Current Exposures and Clinical Manifestations. *New Engl. J. Med.* 2003, 349 (18), 1731–1737.
- Clements, C. J.; Ball, L. K.; Ball, R.; Pratt, D.** Thiomersal in vaccines. *Lancet* 2000, 355 (9211), 1279–1280.
- Cui, C. X.; Gao, X.; Qi, Y. M.; Liu, S. J.; Sun, J. B.** Microstructure and antibacterial property of *in situ* TiO<sub>2</sub> nanotube layers/titanium biocomposites. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012, 8, 178–183.
- Deng, J.-M.; Shi, H.-Z.** Interleukin-16 in asthma. *Chin Med J.* 2006, 119 (12), 1017–1025.
- Ditrichova, D.; Kapralova, S.; Tichy, M.; Ticha, V.; Dobesova, J.; Justova, E.; Eber, M.; Pirek, P.** ORAL LICHENOID LESIONS AND ALLERGY TO DENTAL MATERIALS. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007, 151 (2), 333–339.

- Dórea, J. G.; Farina, M.; Rocha, J. B. T.** Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J. Appl. Toxicol.* 2013, 33 (8), 700–711.
- Dupre, A.; Tournon, P.; Daste, J.; Lassere, J.; Bonafe, J. L.; Viraben, R.** Titanium pigmentation. An electron probe microanalysis study. *Arch Dermatol.* 1985, 121 (5), 656–658.
- Dyring-Andersen, B.; Skov, L.; Løvendorf, M. B.; Bzorek, M.; Søndergaard, K.; Lauritsen, J. P.; Dabelsteen, S.; Geisler, C.; Bonefeld, C. M.** CD4(+) T cells producing interleukin (IL)-17, IL-22 and interferon- $\gamma$  are major effector T cells in nickel allergy. *Contact Dermatitis.* 2013, 68 (6), 339–347.
- Evans, E. M.; Freeman, M. A. R.; Miller, A. J.; Vernon-Roberts, B.** Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 1974, 56 (4), 626–642.
- Fernandes, M. H.** Effect of stainless steel corrosion products on *in vitro* biomineralization. *J Biomater Appl.* 1999, 14 (2), 113–168.
- Forte, G.; Petrucci, F.; Bocca, B.** Metal allergens of growing significance: epidemiology, immunotoxicology, strategies for testing and prevention. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2008, 7 (3), 145–62.
- Friskien, K. W.; Dandie, G. W.; Lugowski, S.; Jordan, G.** A study of titanium release into body organs following the insertion of single threaded screw implants into the mandibles of sheep. *Austr Dent J.* 2002, 47 (3), 214–217.
- Geier, D. A.; Kern, J. K.; Geier, M. R.** A prospective study of prenatal mercury exposure from maternal dental amalgams and autism severity. *Acta Neurobiol Exp* 2009, 69 (2), 189–197.
- Ghalayani, P.; Jahanshahi, G.; Saberi, Z.** Degranulated mast cells and TNF- $\alpha$  in oral lichen planus and oral lichenoid reactions diseases. *Advanced Biomedical Research.* 2012, 1 (3), 52.
- Godiska, R.; Chantry, D.; Raport, C. J.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Leviten, D.; Mantovani, A.; Gray, P. W.** Human Macrophage-derived Chemokine (MDC), a Novel Chemoattractant for Monocytes, Monocyte-derived Dendritic Cells, and Natural Killer Cells. *J. Exp. Med.* 1997, 185 (9), 1595–1604.

- GUZZI, G.; PIGATTO, P. D.; SPADARI, F.; LA PORTA, C. A. M.** Effect of thimerosal, methylmercury, and mercuric chloride in Jurkat T Cell Line. *Interdiscip Toxicol.* 2012, 5 (3), 159–161.
- Haug, R. H.** Retention of asymptomatic bone plates used for orthognathic surgery and facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996, 54 (5), 611–617.
- Hu, L.; Bray, M. D.; Geng, Y.; Kopecko, D. J.** *Campylobacter jejuni*-Mediated Induction of CC and CXC Chemokines and Chemokine Receptors in Human Dendritic Cells. *Infect Immun.* 2012, 80 (8), 2929–2939.
- Chen, W.; Antonenko, S.; Sederstrom, J. M.; Liang, X.; Chan, A. S. H.; Kanzler, H.; Blom, B.; Blazar, B. R.; Liu, Y. J.** Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 2004, 103 (7), 2547–2553.
- Jacobs, J. J.; Gilbert, J. L.; Urban, R. M.** Current concepts review: corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg.* 1998, 80 (2), 268–282.
- Jarrossay, D.; Napolitani, G.; Colonna, M.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A.** Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001, 31 (11), 3388–3393.
- Joska, L.; Venclikova, Z.; Poddana, M.; Benada, O.** The mechanism of gingiva metallic pigmentations formation. *Clin Oral Invest.* 2009, 13 (1), 1–3.
- Kanaji, A.; Caicedo, M. S.; Viridi, A. S.; Sumner, D. R.; Hallab, N. J.; Sena, K.** Co-Cr-Mo alloy particles induce tumor necrosis factor alpha production in MLO-Y4 osteocytes: a role for osteocytes in particle-induced inflammation. *Bone.* 2009, 45 (3), 528–533.
- Katou, F; Andoh, N.; Motegi, K.; Nagura, H.** Immuno-inflammatory responses in the tissue adjacent to titanium miniplates used in the treatment of mandibular fractures. *J Cranio-maxillo-fac Surg.* 1996, 24 (3), 155–162.
- Kim, J. Y.; Huh, K.; Lee, K. Y.; Yang, J. M.; Kim, T. J.** Nickel induces secretion of IFN-gamma by splenic natural killer cells. *Exp Mol Med.* 2009, 41 (4), 288–295.
- Kobayashi, N.; Kayaba, H.; Takeda, M.; Yamaguchi, K.; Chiba, T.; Ito, W.; Chihara, J.** Activation of Eosinophils by Lipopolysaccharide-Induced Monocyte-Derived Cytokines. *Allergol Int.* 2009, 58 (1), 103–110.



- Kou, P. M.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D.; Babensee, J. E.** Dendritic cell responses to surface properties of clinical titanium surfaces. *Acta Biomater.* 2011, 7 (3), 1354–1363.
- Kubies, D.; Himmlová, L.; Riedel, T.; Chánová, E.; Balík, K.; Douděrová, M.; Bártová, J.; Pešáková, V.** The Interaction of Osteoblasts With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. *Physiol Res.* 2011, 60 (1), 95–111.
- Kuroishi, T.; Kinbara, M.; Sato, N.; Tanaka, Y.; Nagai, Y.; Iwakura, Y.; Endo, Y.; Sugawara, S.** Biotin Status Affects Nickel Allergy via Regulation of Interleukin-1 $\beta$  Production in Mice. *J Nutr.* 2009, 139 (5), 1031–1036.
- Lalor, P. A.; Revell, P. A.; Gray, A. B.; Wright, S.; Railton, G. T.; Freeman, M. A.** Sensitivity to titanium. A cause of implant failure. *J Bone Joint Surg Br.* 1991, 73 (1), 25–28.
- Lemmerman, K. J.; Lemmerman, N. E.** Ossteointegrated dental implants in private practice: a long-term case series study. *J. Periodontol.* 2005, 76 (2), 310–319.
- LOFTENIUS, A.; EKSTRAND, J.; MÖLLER, E.** *In vitro* effects of mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) on human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* 1997, 110 (3), 418–422.
- Lu, H.; Huang, D.; Saederup, N.; Charo, I. F.; Ransohoff, R. M.; Zhou, L.** Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J.* 2011, 25 (1), 358–369.
- Lu, T. X.; Hartner, J.; Lim, E. J.; Fabry, V.; Mingler, M. K.; Cole, E. T.; Orkin, S. H.; Aronow, B. J.; Rothenberg, M. E.** MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- $\gamma$  Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity. *J Immunol.* 2011, 187 (6), 3362–3373.
- Mardani, M.; Ghabanchi, J.; Fattahi, M. J.; Tadbir, A. A.** Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Different Clinical Subtypes of Oral Lichen Planus. *Iran J Med Sci.* 2012, 37 (4), 233–237.
- Matthew, I. R.; Frame, J. W.** Allergic response to titanium. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998a, 56 (12), 1466–1467.
- Matthew, I. R.; Frame, J. W.** Ultrastructural analysis of metal particles released from stainless steel and titanium miniplate components in an animal model. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998b, 56 (1), 45–50.

- Merritt, K.; Rodrigo, J. J.** Immune response to synthetic materials: Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin Orthop.* 1996, 326, 71-79.
- Minang, J. T.; Areström, I.; Troye-Blomberg, M.; Lundeberg, L.; Ahlborg, N.** Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response *in vitro* in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol.* 2006a, 146 (3), 417–426.
- Minang, J. T.; Areström, I.; Zuber, B.; Jönsson, G.; Troye-Blomberg, M.; Ahlborg, N.** Nickel-induced IL-10 down-regulates Th1- but not Th2-type cytokine responses to the contact allergen nickel. *Clin Exp Immunol.* 2006b, 143 (3), 494–502.
- Mitchell, D. L.; Synnott, S. A.; VanDercreek, J. A.** Tissue reaction involving an intraoral kin graft and CP titanium abutments: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 1990, 5 (1), 79–84.
- Morais, S.; Sousa, J. P.; Fernandes, M. H.; Carvalho, G. S.** In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts. *Biomater.* 1998, 19 (1-3), 13-21.
- Mosser, D. M.; Edwards, J. P.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008, 8 (12), 958-69.
- Moulon, C.; Choleva, Y.; Thierse, H. - J.; Wild, D.; Weltzien, H. U.** T Cell Receptor Transfection Shows Non-HLA-Restricted Recognition of Nickel by CD8<sup>+</sup> Human T Cells to be Mediated by  $\alpha\beta$  T Cell Receptors. *J Invest Dermatol.* 2003, 121 (3), 496–501.
- Nada, A.; Abdel-Wahab, M.; Sroor, A.; Abdel-Haleem, A. S.; Abdel-Sabour, M. F.** Heavy metals and rare earth elements source-sink in some Egyptian cigarettes as determined by neutron activation analysis. *App Rad Isotop.* 1999, 51 (1), 131-136.
- Olstad, M. L.; Holland, R. I.; Wandel, N.; Pettersen, A. H.** Correlation between amalgam restorations and mercury concentrations in urine. *J. Dent. Res.* 1987, 66 (6), 1179–1182.
- Parr, G. R.; Gardner, L. K.; Toth, R. W.** Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. *J Prosthet Dent.* 1985, 54 (3), 410-4.
- Pennino, D.; Eyerich, K.; Scarponi, C.; Carbone, T.; Eyerich, S.; Nasorri, F.; Garcovich, S.; Traidl-Hoffmann, C.; Albanesi, C.; Cavani, A.** IL-17 Amplifies Human

Contact Hypersensitivity by Licensing Hapten Nonspecific Th1 Cells to Kill Autologous Keratinocytes. *J Immunol.* 2010, 184 (9), 4880–4888.

**Perera, P.-Y.; Lichy, J. H.; Waldmann, T. A.; Perera, L. P.** The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. *Microbes Infect.* 2012, 14 (3), 247–261.

**Pešáková, V.; Smetana Jr., K.; Sochor, M.; Hulejová, H.; Balík, K.** Biological properties of the intervertebral cages made of titanium containing a carbon-carbon composite covered with different polymers. *J Mater Sci Mater Med.* 2005, 16 (2), 143–148.

**Petit-Bertron, A-F.; Fitting, C.; Cavaillon, J-M.; Adib-Conquy, M.** Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. *J Leukoc Biol.* 2003, 73 (1), 145–154.

**Podzimek, S.; Procházková, J.; Bultasova, L.; Bartova, J.; Ulcova-Gallova, Z.; Mrklas, L.; Stejskal, V. D.** Sensitization to inorganic mercury could be a risk factor for infertility. *Neuroendocrinol. Lett.* 2005, 26 (4), 277–282.

**Pouralibaba, F; Babaloo, Z; Pakdel, F; Aghazadeh, M.** Serum Level of Interleukin-17 in Patients with Erosive and Non-erosive Oral Lichen Planus. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects.* 2013, 7 (2), 91–94.

**Procházková, J.; Bártová, J.; Ivašková, E.; Kupková, I.; Šterzl, I.; Stejskal, V. D.** HLA-Association in patients with intolerance to mercury and other metals in dental materials. *Dis Mark.* 2000, 16 (3-4), 135-138.

**Procházková, J.; Kučerová, H.; Houšová, D.** Alergická onemocnění a dentální materiály. *LKS.* 2004a, 14 (1), 13-15.

**Procházková, J.; Šterzl, I.; Kučerová, H.; Bártová, J.; Stejskal, V. D. M.** The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. *Neuro Endocrinol Lett.* 2004c, 25 (3), 211-218

**Procházková, J.; Šterzl, I.; Nerudová, J.; Čábelková, Z.; Kryštůfková, O. et al.** Vliv těžkých kovů v dentálních materiálech jako rizikový faktor při rozvoji autoimunitního onemocnění. Závěrečná zpráva Výzkumného projektu IGA MZ ČR č. NK 6775-3, 2004b.

**Putoczki, T.; Ernst, M.** More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol.* 2010, 88 (6), 1109–1117.

- Qi, Y.; Liang, J.; She, Z-G.; Cai, Y.; Wang, J.; Lei, T.; Stallcup, W. B.; Fu, M.** MCP-induced protein 1 suppresses TNF $\alpha$ -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells. *FEBS Lett.* 2010, 584 (14), 3065–3072.
- Quabius, E. S.; Ossenkop, L.; Harder, S.; Kern, M.** Dental implants stimulate expression of Interleukin-8 and its receptor in human blood--an *in vitro* approach. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012, 100 (5), 1283–1288.
- Rahilly, G.; Price, N.** Nickel allergy and orthodontics. *J Orthod.* 2003, 30 (2), 171-4.
- Rao, D. A.; Tracey, K. J.; Pober, J. S.** IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Are Endogenous Mediators Linking Cell Injury to the Adaptive Alloimmune Response. *J Immunol.* 2007, 179 (10), 6536–6546.
- Revell, P. A.; Lalor, P. A.** Massive exposition to titanium, but without sensitization. *Acta Orthopaed Scand.* 1995, 66 (5), 484.
- Rissoan, MC.; Soumelis, V.; Kadowaki, N.; Grouard, G.; Briere, F.; de Waal Malefyt, R.; Liu, YJ.** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999, 283 (5405), 1183-1186.
- Saito, K.** Analysis of genetic factor of metal allergy; polymorphism of HLA-DR, DQ gene. *Kokubyo Gakkai Zasshi.* 1996, 63 (1), 53-69.
- Sebastiani, S.; Albanesi, C.; Nasorri, F.; Girolomoni, G.; Cavani, A.** Nickel-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Display Distinct Migratory Responses to Chemokines Produced During Allergic Contact Dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2002, 118 (6), 1052–1058.
- Seckin Ertugrul, A.; Arslan, U.; Dursun, R.; Sezgin Hakki, S.** Periodontopathogen profile of healthy and oral lichen planus patients with gingivitis or periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2013, 5 (2), 92–97.
- Schäfer, T.; Böhler, E.; Ruhdorfer, S.; Weigl, L.; Wessner, D.; Filipiak, B.; Wichmann, H. E.; Ring, J.** Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 2001, 56 (12), 1192–1196.
- Schildberger, A.; Rossmanith, E.; Eichhorn, T.; Strassl, K.; Weber, V.** Monocytes, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and THP-1 Cells Exhibit Different Cytokine Expression Patterns following Stimulation with Lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2013, 2013: 697972.

**Schnorr, D.; Muniz, A. C.; Passos, S.; Guimaraes, L. H.; Lago, E. L.; Bacellar, O.; Glesby, M. J.; Carvalho, E. M.** IFN- $\gamma$  Production to Leishmania Antigen Supplements the Leishmania Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012, 6 (12), e1947.

**Smith, D. C.; Lugowski, S.; McHugh, A.; Deporter, D.; Watson, P. A.; Chipman, M.** Systemic metal ion levels in dental implant patients. *Int J of Oral Maxillofac Impl.* 1997, 12 (6), 828–834.

**Stary, G.; Klein, I.; Bauer, W.; Koszik, F.; Reininger, B.; Kohlhofer, S.; Gruber, K.; Skvara, H.; Jung, T.; Stingl, G.** Clucocorticosteroids Modify Langerhans Cells To Produce TGF- $\beta$  and Expand Regulatory T Cells. *J Immunol.* 2011, 186 (1), 103–112.

**Stejskal, V. D. M.** Allergy to Grugs and Other Chemicals Diagnosed by the Presence of Specific Memory Cells in Human Blood. In *Realm of Tolerance*, Ed.; Springer-Verlag: Německo, 1989; pp 213–225.

**Stejskal, V. D. M.; Cederbrant, K.; Lindvall, A.; Forsbeck, M.** MELISA- an *in vitro* toll for the study of metal Allergy. *Toxicol In Vitro.* 1994, 8 (5), 991-1000.

**Stewart, J. L.; Sally, E. W.** Narrative Reviews: The role of Th2 Immune Pathway Modulation in the Treatment of Severe Asthma and Its Phenotypes. *Ann. Inter. Med.* 2010, 152, 232–237.

**Sykaras, N.; Iacopino, A. M.; Marker, V. A.; Triplett, R. G.; Woody, R. D.** Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2000, 15 (5), 675–690.

**Šterzl, I.; Hrdá, P.; Procházková, J.; Bártová, J.; Matucha, P.** Reakce na kovy u pacientů s chronickou únavou a autoimunitní endokrinopatií. *Vnitř Lék.* 1999b, 45 (9), 527-531.

**Šterzl, I.; Procházková, J.; Hrdá, P.; Bártová, J.; Matucha, P.; Stejskal, V.** Mercury and nickel allergy: risk factors in fatigue and autoimmunity. *Neuro Endocrin Lett.* 1999a; 20 (3-4), 221-228.

**Thierse, H.-J.; Moulon, C.; Allespach, Y.; Zimmermann, B.; Doetze, A.; Kuppig, S.; Wild, D.; Herberg, F.; Weltzien, H. U.** Metal-Protein Complex-Mediated Transport and Delivery of Ni<sup>2+</sup> to TCR/MHC Contact Sites in Nickel-Specific Human T Cell Activation. *J Immunol.* 2004, 172 (3), 1926–1934.

- Torgersen, S.; Gjerdet, N. R.; Erichsen, E. S.; Bang, G.** Metal particles and tissue changes adjacent to miniplates. A retrieval study. *Acta Odontol Scand.* 1995a, 53 (2), 65–71.
- Torgersen, S.; Moe, G.; Jonsson, R.** Immunocompetent cells adjacent to stainless steel and titanium miniplates and screws. *Eur J Oral Sci.* 1995b, 103 (1), 46–54.
- Trinchieri, G.** Interleukin-12: A Cytokine Produced by Antigen-Presenting Cells with Immunoregulatory Functions in the Generation of T-Helper Cells Type 1 and Cytotoxic Lymphocytes. *Blood.* 1994, 84 (12), 4008–4027.
- Tso, C.; Rye, K-A.; Barter, P.** Phenotypic and Functional Changes in Blood Monocytes Following Adherence to Endothelium. *PLoS ONE* 2012, 7 (5), e37091.
- Uçar, Y.; Brantley, W. A.** Biocompatibility of Dental Amalgams. *Int J Dent.* 2011, 2011:98159.
- Venclíková, Z.; Bártová, J.; Běláček, J.** Sledování tvorby cytokinů u tkáňové kultury lidských makrofágů stimulovaných ionty kovů. *Česká stomatologie* 2013, 113 (3), 80–84.
- Venclíková, Z.; Benada, O.; Bártová, J.; Joska, L.; Mrklas, L.** Metallic Pigmentation of Human Teeth and Gingiva: Morphological and Immunological Aspects. *Dent Mater J.* 2007, 26 (1), 96-104.
- Viemann, D.; Schmidt, M.; Tenbrock, K.; Schmid, S.; Müller, V.; Klimmek, K.; Ludwig, S.; Roth, J.; Goebeler, M.** The Contact Allergen Nickel Triggers a Unique Inflammatory and Proangiogenic Gene Expression Pattern via Activation of NF- $\kappa$ B and Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . *J Immunol.* 2007, 178 (5), 3198–3207.
- Vimy, M. J.; Lorscheider, F. L.** Intra-oral air mercury released from dental amalgam. *J. Dent. Res.* 1985a, 64 (8), 1069–1071.
- Vimy, M. J.; Lorscheider, F. L.** Serial measurements of intra-oral air mercury: estimation of daily dose from dental amalgam. *J. Dent. Res.* 1985b, 64 (8), 1072–1075.
- WALSH, G. M.; HARTNELL, A.; WARDLAW, A. J.; KURIHARA, K.; SANDERSONQ, C. J.; KAY, A. B.** IL-5 enhances the *in vitro* adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology.* 1990 Oct;71(2):258-65. 1990, 71 (2), 258–265.

**Wilhelmi, V.; Fischer, U.; Weighardt, H.; Schulze-Osthoff, K.; Nickel, C.; Stahlmecke, B.; Kuhlbusch, T. A. J.; Scherbart, A. M.; Esser, Ch.; Schins, R. P. F; Albrecht, C.** Zinc Oxide Nanoparticles Induce Necrosis and Apoptosis in Macrophages in a p47phox- and Nrf2-Independent Manner. *PLoS One*. 2013, 8 (6), e65704.

**Williams, D. F.** Definitions in biomaterials. 1987, Elsevier, Amsterdam.

**Yamaura, K.; Doi, R.; Suwa, E.; Ueno, K.** Repeated application of glucocorticoids exacerbate pruritus via inhibition of prostaglandin D<sub>2</sub> production of mast cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *J Toxicol Sci*. 2012, 37 (6), 1127–1134.

**Yoshihisa, Y.; Shimizu, T.** Metal Allergy and Systemic Contact Dermatitis: An Overview. *Dermatol Res Pract*. 2012, 2012:749561, doi: 10.1155/2012/749561.

**Yoshimura, T.; Howard, O. M. Z.; Ito, T.; Kuwabara, M.; Matsukawa, A.** Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2013, 8 (3), e58791.

**Zhou, L.; Somasundaram, R.; Nederhof, R. F.; Dijkstra, G.; Faber, K. N.; Peppelenbosch, M. P.; Fuhler, G. M.** Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional Studies. *Clin Vaccine Immunol*. 2012, 19 (7), 1065–1074.

Internetové zdroje:

1. <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/oraliumtechnickulist.pdf>
2. <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/oraliumceramictechnickulist.pdf>
3. <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/soubory/koldanttechnickulist.pdf>
4. [http://heraeus-dental.se/media/webmedia\\_local/media/hera/66034837\\_Legierungstabelle\\_GB.pdf](http://heraeus-dental.se/media/webmedia_local/media/hera/66034837_Legierungstabelle_GB.pdf)
5. [http://begousa.com/media/Wiron99\\_brochure.pdf](http://begousa.com/media/Wiron99_brochure.pdf)
6. <http://www.safina.cz/sites/www.safina.cz/files/produkty/soubory/aurosatechnickulist.pdf>
7. <http://www.dentsplymea.com/products/restorative/amalgams/dispersalloy>
8. <http://www.septodont.co.uk/products/securalloy?from=251&cat=7>
9. <http://www.septodont.co.uk/products/septalloy-ng-70?from=251&cat=7>
10. <http://www.septodont.co.uk/products/septalloy-ng-70?from=251&cat=7>

# Přílohy

Proudy max.:

Sliny:

Foto:

Stery:

## DOTAZNÍK K METODĚ MELISA®

Budete testován(a) metodou MELISA® na případnou přecitlivělost na kovy. Abychom byli schopni správně vyhodnotit výsledky tohoto testu, žádáme Vás o pokud možno co nejpřesnější vyplnění tohoto dotazníku. Pokud by prostor na psaní nestačil, použijte čistý list papíru. Vámi uvedené informace v tomto dotazníku jsou chráněné lékařským tajemstvím.

Jméno a příjmení: ..... Rodné číslo: .....

Pojišťovna: ..... Datum vyšetření: .....

Kontaktní adresa: ..... PSČ: .....

Telefon: ..... Fax ..... E-mail .....

Jméno a adresa Vašeho lékaře, od kterého máte doporučení k provedení testu MELISA®:

.....  
..... Telefon: .....

Vaše současné zaměstnání (doba trvání) .....

Vaše předchozí zaměstnání (doba trvání) .....

Přicházíte profesně do styku s kovy doma nebo v zaměstnání (broušení, leštění, lakování atd.)?

ANO NE

Pokud ano, za jakých okolností a s kterými kovy (vč. let expozice)?

.....  
.....

Kouříte? ANO NE

Pokud ano, kolik cigaret denně? ..... Od kdy? .....

Kouřil(a) jste dříve? ANO NE

Pokud ano, kolik cigaret denně? ..... Od kdy a jak dlouho? .....

Jste doma nebo v zaměstnání v kuřáckém prostředí? ANO NE

Užíváte v **současné době** nějaké léky na alergii (např. antihistaminika, kortikoidy), imunosupresivní léky (např. kortikoidy) nebo léky na štítnou žlázu (např. Euthyrox či jiné hormony štítné žlázy)?

Název: ..... Dávkování? .....

Název: ..... Dávkování? .....

Název: ..... Dávkování? .....

Máte diagnostikováno nějaké onemocnění? (žloutenka, EBV viróza, borelióza, vysoký krevní tlak, porucha štítné žlázy, atopický ekzém, revmatoidní artritida, diabetes, gastritida atd.)

Vaše dřívější a **současná** léčba (od kdy, doba, léky vč. homeopatik):

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Jaké ..... Od kdy ..... Léčba .....

Užíváte pravidelně vitamínové preparáty?(denně, obden, sezónně, ....)

Název: ..... Jak často? .....

Název: ..... Jak často? .....

Pokud pozorujete vedlejší účinky u kterýchkoli z výše uvedených preparátů, popište je.....

.....

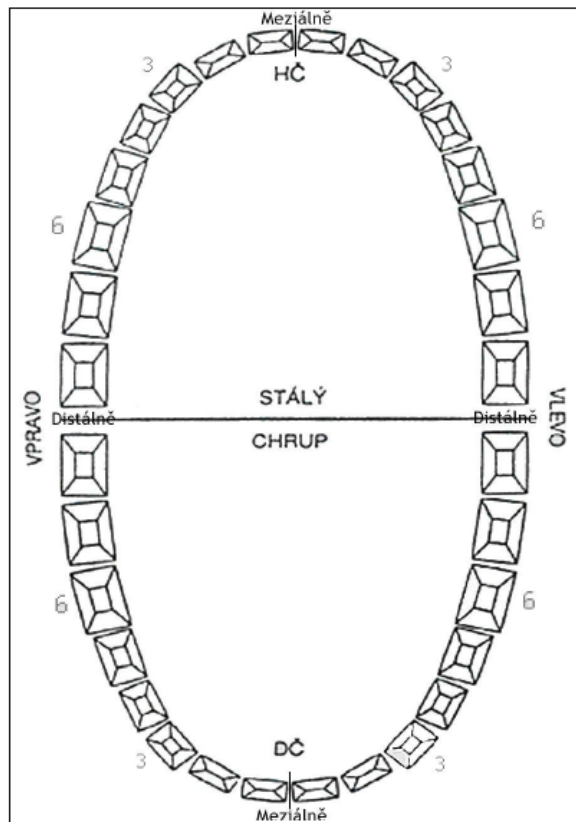
.....



Dostal(a) jste někdy gamaglobulin či jinou vakcínu jako prevenci či léčbu? Pokud ano, jakou.....	ANO	NE
Máte v těle voperován nějaký implantát (umělý kloub, hřeby a dlahy u zlomenin, kardiostimulátor, silikonový prsní implantát, jiný implantát)? Pokud ano, specifikujte jaký a od kdy? .....	ANO	NE
Používáte pravidelně oční kapky? Pokud ano, jaké (vč. výrobce).....	ANO	NE
Používáte nebo používal(a) jste kontaktní čočky? Pokud ano, jaký roztok na kontaktní čočky jste používal(a).....	ANO	NE
Žvýkáte žvýkačku? Jakou značku? ..... Jak často? ... x - denně - obden - týdně - měsíčně .....	ANO	NE
Máte nebo měl(a) jste nějaké tetování? Od kdy (jak dlouho)..... Jak velké (cm <sup>2</sup> ).....	ANO	NE
Byl(a) jste někdy léčen(a) preparáty obsahujícími zlato? Pokud ano, specifikujte (název, výrobce).....	ANO	NE
Zaregistroval(a) jste během léčby vedlejší účinky? Pokud ano, specifikujte.....	ANO	NE
Nosíte nebo nosil(a) jste náušnice nebo piercing? Z jakého materiálu byly zhotoveny? zlato - bílé zlato - stříbro - chir. ocel - bižuterie - titan - jiné:.....	ANO	NE
Měl(a) jste s náušnicemi (piercingem) nějaké zdravotní potíže? Z jakého materiálu byly zhotoveny? zlato - bílé zlato - stříbro - chir. ocel - bižuterie - titan - jiné:..... Za jak dlouho po nasazení se objevily potíže?..... hodiny - druhý den - týden - jenom někdy ..... O jaké potíže se jednalo? .....	ANO	NE
Pozorujete nějaké zdravotní potíže po kontaktu s kovovými předměty jako jsou jeansovými knoflíky, náramkovými hodinkami, řetízky, náramky či klenoty? Pokud ano: Z jakého materiálu byly zhotoveny? zlato - bílé zlato - stříbro - chir. ocel - bižuterie - titan - jiné:..... Za jak dlouho se objevily potíže? .....hodiny - druhý den - týden - jenom někdy ..... O jaké potíže se jednalo? .....	ANO	NE
Dochází nebo docházelo u Vás k <b>pravidelnému černání</b> kovových předmětů? Za jak dlouho po nasazení se černání objevilo?.....hodiny - druhý den - týden - jenom někdy ..... O jaké kovy se jednalo? zlato - bílé zlato - stříbro - chir. ocel - bižuterie - titan - jiné:.....	ANO	NE
Byl u Vás proveden někdy <b>kožní test</b> citlivosti? Jméno lékaře..... Oddělení, adresa..... Výsledek testu.....	ANO	NE
Pozoroval(a) jste nějaké změny svého zdravotního stavu v souvislosti s kožními testy? Pokud ano, jaké.....	ANO	NE
Byl(a) jste někdy desenzibilizován(a) (potlačení alergie) pylovým či prachovým extraktem nebo extraktem z včelího vosku? Pokud ano, proč, kdy a na jak dlouho.....	ANO	NE
Máte alergii na kosmetiku? Pokud ano, na jaké produkty - specifikujte včetně výrobce.....	ANO	NE

Jste alergický(á) na penicilin či jiné léky? Na jaké? .....	ANO	NE
Máte potravinovou alergii? Na jaké potraviny? .....	ANO	NE
Jaké jsou příznaky a kdy začaly? .....		
Máte ještě jiný typ alergie? Jaký? .....	ANO	NE
Žijete či žil(a) jste v blízkosti továrny, krematoria, dálnice nebo letiště? Kde..... Od kdy..... Jak dlouho.....	ANO	NE
Vyskytuje se některé z těchto onemocnění ve Vaší rodině?( <i>Alergie, Autoimunitní onemocnění, Kožní onemocnění, Kardiovaskulární onemocnění, Diabetes, Nádory, Chemická přecitlivělost, Psychiatrická choroba a jiné</i> )		
<b>Rodiče:</b>	<b>Věk</b>	<b>Onemocnění</b>
.... <i>Otec</i> ....	.....	.....
.... <i>Matka</i> ....	.....	.....
<b>Sourozenci:</b>	<b>Věk</b>	<b>Onemocnění</b>
.... <i>Bratr</i> ....	.....	.....
.... <i>Sestra</i> ....	.....	.....
<b>Děti:</b>	<b>Věk</b>	<b>Onemocnění</b>
.... <i>Dcera</i> ....	.....	.....
.... <i>Syn</i> ....	.....	.....
Místo pro další informace o zdravotním stavu (sled vážnějších onemocnění, úrazů, chirurgických zákroků atd.)		
Rok	Informace o zdravotním stavu	
.....	.....	
.....	.....	
.....	.....	
.....	.....	
.....	.....	
.....	.....	
<b>Pokud jste žena:</b>		
Máte zavedeno IU tělísko?	ANO	NE
Měla jste někdy zavedené IU tělísko?	ANO	NE
Pokud ano, pozorovala jste v době, kdy bylo IU tělísko zavedeno nějaké zdravotní potíže?	ANO	NE
Z jakého materiálu bylo tělísko? .....		
O jaké potíže se jednalo? .....		
Průběh gravidit a porodu: .....		
Pokud jste Rh- ,dostala jste po porodu anti-D-globulin?	ANO	NE
Pokud ano, udejte rok aplikace.....		

Rok nasazení:



OPG:

kopie

VUS

Tetováž sliznice:

Eflorescence:

Implantáty:

Použité materiály:

Amalgam

Kompozita

Skoionomerní cement (GIC)

Aurix

Metalokeramika

Metalokompozita

Keramika

Důvod vyšetření (problém; od kdy; okolnosti vzniku, zlepšení, zhoršení po):

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Pacient byl(a) vyšetřen(a) na.....

Doporučeno: KT-Žemličková; KT-Machovcová; Mykologie; Imunologie – Hybenová

Afty: ANO NE Jak často:..... Počet: .... x solitérní nebo .... x multiforní

**Příznaky (zakřížkujte):** Místní

Celkové

Pálení sliznic  Puchýřky na sliznici  Vazké sliny  Kovová chuť

Kožní projevy  Nausea a zvracení  Malátnost  Bolesti hlavy

Nadměrné pocení  Poruchy srdečního rytmu  Poruchy dechu  Jiné

Tab. 14 Korelační matice měřených cytokinů se znárodněnými hodnotami korelačního Spearmanova koeficientu. Barevně jsou vyznačeny p-hodnoty; červeně je označena statistická významnost na hladině  $p < 0,001$ , zeleně  $p < 0,01$ , žlutě  $p < 0,05$  a modře bez statistické významnosti.

	TNF- $\alpha$	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	IFN- $\gamma$	IL-12p70	TNF- $\beta$	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12p40	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL6	IL-13	IL-15	IL-17	IP-10	M-CSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	MIP-16	TGF- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	1,000	0,894	0,538	0,793	0,764	0,805	0,781	0,951	0,269	0,838	0,672	0,791	0,748	0,806	0,849	0,655	0,555	0,909	0,908	0,878	0,674	0,931	0,877	0,645	0,527	0,770	0,953
EOTAXIN	0,804	1,000	0,633	0,910	0,819	0,908	0,822	0,834	0,461	0,860	0,689	0,839	0,731	0,879	0,921	0,814	0,577	0,811	0,903	0,882	0,584	0,832	0,867	0,593	0,563	0,803	0,828
EOTAXIN-2	0,538	0,633	1,000	0,586	0,884	0,565	0,674	0,555	0,423	0,697	0,653	0,737	0,636	0,732	0,695	0,521	0,510	0,620	0,615	0,546	0,583	0,535	0,671	0,473	0,532	0,659	0,656
GCSF	0,793	0,910	0,569	1,000	0,927	0,900	0,820	0,773	0,630	0,929	0,800	0,834	0,725	0,797	0,874	0,788	0,705	0,796	0,848	0,767	0,522	0,868	0,828	0,657	0,565	0,826	0,761
GM-CSF	0,764	0,819	0,884	0,927	1,000	0,877	0,909	0,718	0,645	0,943	0,851	0,920	0,900	0,860	0,869	0,747	0,843	0,826	0,816	0,681	0,643	0,791	0,841	0,718	0,632	0,842	0,820
IFN- $\gamma$	0,805	0,908	0,565	0,900	0,877	1,000	0,912	0,798	0,553	0,884	0,774	0,913	0,810	0,916	0,932	0,794	0,729	0,800	0,832	0,801	0,650	0,795	0,878	0,628	0,645	0,862	0,829
IL-12p70	0,781	0,822	0,674	0,820	0,909	0,912	1,000	0,754	0,576	0,867	0,887	0,965	0,866	0,878	0,914	0,731	0,809	0,819	0,831	0,702	0,493	0,723	0,849	0,651	0,689	0,807	0,856
TNF- $\beta$	0,951	0,834	0,555	0,773	0,718	0,798	0,784	1,000	0,149	0,796	0,589	0,747	0,651	0,779	0,859	0,828	0,428	0,935	0,927	0,893	0,636	0,918	0,890	0,579	0,441	0,740	0,939
IL-8	0,269	0,461	0,423	0,630	0,645	0,553	0,576	0,149	1,000	0,583	0,790	0,655	0,553	0,499	0,494	0,426	0,754	0,281	0,346	0,182	0,193	0,325	0,418	0,425	0,565	0,533	0,336
IL-10	0,838	0,880	0,697	0,929	0,943	0,864	0,867	0,798	0,583	1,000	0,816	0,904	0,752	0,825	0,870	0,789	0,714	0,858	0,850	0,792	0,471	0,894	0,891	0,726	0,656	0,891	0,843
IL-11	0,672	0,689	0,653	0,800	0,851	0,774	0,887	0,589	0,780	0,816	1,000	0,929	0,774	0,803	0,828	0,654	0,617	0,747	0,741	0,565	0,464	0,631	0,766	0,588	0,714	0,662	0,787
IL-12p40	0,791	0,839	0,737	0,834	0,920	0,913	0,965	0,747	0,665	0,904	0,929	1,000	0,859	0,924	0,928	0,776	0,826	0,841	0,838	0,729	0,551	0,739	0,869	0,652	0,709	0,813	0,876
IL-1 $\alpha$	0,746	0,731	0,635	0,725	0,900	0,810	0,866	0,651	0,553	0,752	0,774	0,859	1,000	0,839	0,782	0,664	0,808	0,738	0,719	0,587	0,495	0,685	0,709	0,782	0,723	0,804	0,771
IL-1 $\beta$	0,806	0,879	0,732	0,797	0,860	0,916	0,878	0,779	0,499	0,825	0,803	0,924	0,839	1,000	0,949	0,785	0,695	0,851	0,867	0,805	0,673	0,721	0,858	0,619	0,658	0,761	0,887
IL-2	0,849	0,921	0,695	0,874	0,869	0,932	0,914	0,859	0,494	0,870	0,828	0,928	0,782	0,949	1,000	0,826	0,709	0,887	0,941	0,847	0,592	0,805	0,881	0,617	0,639	0,761	0,923
IL-4	0,855	0,814	0,521	0,788	0,747	0,794	0,731	0,628	0,426	0,789	0,654	0,776	0,664	0,785	0,826	1,000	0,606	0,828	0,842	0,767	0,683	0,791	0,758	0,443	0,386	0,687	0,824
IL6	0,555	0,577	0,510	0,705	0,843	0,729	0,809	0,428	0,754	0,714	0,817	0,826	0,808	0,685	0,709	0,606	1,000	0,576	0,583	0,388	0,333	0,506	0,575	0,645	0,809	0,676	0,608
IL-13	0,909	0,811	0,620	0,796	0,826	0,800	0,819	0,935	0,281	0,856	0,747	0,841	0,738	0,851	0,887	0,828	0,576	1,000	0,950	0,860	0,640	0,697	0,893	0,606	0,506	0,726	0,968
IL-15	0,908	0,903	0,615	0,846	0,816	0,832	0,831	0,927	0,346	0,850	0,741	0,838	0,719	0,867	0,941	0,842	0,583	0,950	1,000	0,901	0,548	0,874	0,872	0,632	0,530	0,716	0,951
IL-17	0,878	0,882	0,546	0,787	0,881	0,801	0,702	0,693	0,182	0,792	0,565	0,729	0,587	0,805	0,847	0,767	0,388	0,960	0,901	1,000	0,528	0,885	0,818	0,590	0,461	0,706	0,870
IP-10	0,674	0,584	0,583	0,522	0,643	0,650	0,493	0,636	0,193	0,471	0,464	0,551	0,495	0,673	0,562	0,683	0,333	0,640	0,548	0,528	1,000	0,615	0,677	0,113	0,195	0,526	0,629
M-CSF	0,931	0,832	0,535	0,668	0,791	0,796	0,723	0,918	0,325	0,894	0,831	0,739	0,665	0,721	0,805	0,791	0,506	0,897	0,874	0,865	0,615	1,000	0,882	0,682	0,508	0,833	0,665
MIG	0,877	0,867	0,671	0,828	0,841	0,878	0,849	0,890	0,418	0,891	0,766	0,869	0,709	0,858	0,881	0,758	0,576	0,893	0,872	0,818	0,677	0,882	1,000	0,660	0,601	0,822	0,908
MIP-1 $\alpha$	0,648	0,593	0,473	0,657	0,716	0,828	0,651	0,579	0,425	0,726	0,588	0,652	0,752	0,619	0,617	0,443	0,645	0,606	0,632	0,590	0,113	0,682	0,660	1,000	0,822	0,778	0,838
MIP-1 $\beta$	0,527	0,593	0,532	0,595	0,832	0,645	0,689	0,441	0,566	0,655	0,714	0,709	0,723	0,658	0,639	0,386	0,606	0,506	0,530	0,461	0,195	0,508	0,601	0,822	1,000	0,689	0,543
MIP-16	0,770	0,803	0,659	0,826	0,842	0,862	0,807	0,740	0,533	0,891	0,662	0,813	0,804	0,761	0,761	0,687	0,676	0,728	0,716	0,708	0,526	0,833	0,822	0,778	0,889	1,000	0,757
TGF- $\beta$ 1	0,953	0,828	0,656	0,761	0,820	0,829	0,856	0,939	0,336	0,843	0,767	0,876	0,771	0,887	0,923	0,624	0,608	0,968	0,951	0,870	0,629	0,868	0,808	0,638	0,543	0,787	1,000

Tab. 15 Korelační matice porovnání měřených cytokinů a kovů, které byly použity ke stimulaci monocytů a PBMC. V tabulce jsou znázorněny hodnoty korelačního Spearmanova koeficientu. Barevně jsou vyznačeny p-hodnoty; zeleně je označena statistická významnost na hladině  $p < 0,01$ , žlutě  $p < 0,05$  a modře bez statistické významnosti.

	Hg	Ag	Al	Au	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mo	Ni	Pd	Pt	Sn	TiO2	Zn
TNF- $\alpha$	-0,139	0,321	-0,028	-0,009	0,143	-0,132	-0,068	0,710	0,479	0,733	-0,511	-0,318	0,235	0,036	-0,308	0,133
EOTAXIN	-0,101	0,128	-0,228	-0,030	-0,429	-0,331	0,194	0,508	0,139	0,285	-0,563	-0,459	-0,064	0,222	-0,352	0,059
EOTAXIN-2	-0,209	-0,009	-0,601	0,233	0,429	-0,288	0,011	0,503	-0,309	-0,067	-0,274	-0,250	-0,077	0,106	-0,671	-0,183
GCSF	0,060	0,241	0,018	0,077	-0,300	-0,264	0,352	0,575	0,243	0,393	-0,566	-0,347	0,132	0,530	-0,588	0,455
GM-CSF	-0,044	0,071	-0,345	0,294	0,029	-0,218	0,209	0,626	-0,083	0,200	-0,335	-0,264	0,022	0,218	-0,600	0,167
ICAM-1	-0,055	-0,152	-0,490	0,428	0,257	-0,275	0,125	0,459	-0,527	0,297	0,035	0,238	0,248	-0,136	-0,469	0,083
IFN- $\gamma$	-0,107	0,090	-0,245	0,253	-0,200	-0,288	0,200	0,679	-0,064	0,418	-0,332	-0,300	0,090	-0,132	-0,420	0,100
IL-12p70	-0,148	0,199	-0,077	0,191	0,029	-0,007	0,286	0,701	0,139	0,515	-0,318	-0,280	0,224	-0,009	-0,235	0,167
TNF- $\beta$	-0,226	0,323	-0,119	-0,123	-0,200	-0,182	-0,125	0,640	0,370	0,588	-0,519	-0,353	0,130	0,002	-0,287	0,000
IL-8	0,165	-0,084	-0,084	0,305	0,600	-0,282	0,560	0,323	-0,182	0,345	-0,118	-0,009	0,178	0,059	-0,105	0,333
IL-10	-0,071	0,235	-0,098	0,164	0,429	-0,186	0,073	0,688	0,212	0,552	-0,525	-0,491	0,077	0,286	-0,667	0,367
IL-11	0,024	0,109	-0,025	0,320	0,371	-0,105	0,438	0,534	0,127	0,624	-0,284	-0,118	0,262	0,030	0,018	0,450
IL-12p40	-0,064	0,170	-0,112	0,224	0,429	-0,170	0,288	0,684	0,103	0,590	-0,344	-0,191	0,249	0,036	-0,235	0,285
I-309	-0,039	-0,100	-0,727	-0,203	0,462	-0,557	0,015	0,064	-0,418	0,067	-0,136	0,143	-0,178	-0,015	-0,399	0,050
IL-1 $\alpha$	0,009	-0,051	-0,245	0,267	0,314	-0,171	0,442	0,495	-0,173	0,188	-0,162	-0,141	0,222	-0,194	-0,329	0,233
IL-1 $\beta$	-0,135	-0,003	-0,350	0,281	0,029	-0,300	0,095	0,679	-0,109	0,285	-0,230	-0,200	0,103	-0,185	-0,406	-0,233
IL-2	-0,088	0,120	-0,273	0,042	0,257	-0,211	0,095	0,648	0,139	0,418	-0,457	-0,279	0,064	0,043	-0,385	-0,067
IL-3	-0,130	0,176	-0,154	0,125	0,314	-0,224	0,015	0,745	0,036	0,539	-0,369	-0,303	0,156	-0,141	-0,322	0,033
IL-4	-0,131	0,240	-0,245	0,047	0,257	-0,157	-0,064	0,754	0,176	0,418	-0,423	-0,243	0,174	0,096	-0,441	-0,092
IL-6	0,168	0,034	-0,154	0,181	0,657	-0,015	0,288	0,464	-0,300	0,164	-0,096	-0,024	0,143	-0,094	-0,385	0,233
IL-6sR	-0,172	-0,078	-0,594	0,482	0,600	-0,300	-0,011	0,534	-0,576	0,200	-0,062	0,076	0,125	-0,150	-0,524	-0,033
IL-7	-0,089	-0,090	-0,527	0,304	-0,200	-0,176	0,309	0,673	-0,233	0,571	-0,409	0,007	0,336	-0,224	-0,283	0,036
IL-13	-0,109	0,309	-0,028	0,051	0,143	-0,181	-0,084	0,664	0,444	0,636	-0,433	-0,306	0,196	0,107	-0,312	0,159
IL-15	-0,123	0,213	-0,161	-0,133	-0,143	-0,268	0,033	0,508	0,188	0,394	-0,515	-0,391	-0,009	0,077	-0,280	-0,083
IL-16	-0,146	-0,096	-0,490	0,575	0,086	-0,232	0,037	0,437	-0,515	0,236	0,044	0,221	0,270	-0,139	-0,434	-0,067
IL-17	-0,219	0,360	-0,011	-0,297	0,086	-0,214	-0,031	0,560	0,370	0,503	-0,552	-0,400	0,114	0,182	-0,252	0,067
IP-10	-0,366	0,164	-0,371	0,414	-0,657	-0,257	-0,165	0,626	0,006	0,345	-0,183	-0,024	0,257	0,018	-0,406	-0,300
MCP-1	0,035	-0,205	-0,049	0,423	0,657	-0,103	0,358	0,235	-0,509	0,358	0,004	0,265	0,521	-0,288	0,189	0,017
MCP-2	-0,309	-0,012	-0,294	0,294	-0,429	-0,150	0,029	0,657	0,261	0,491	-0,612	-0,308	0,305	0,193	-0,573	-0,167
M-CSF	-0,220	0,358	-0,007	-0,082	-0,143	-0,150	-0,090	0,662	0,527	0,648	-0,632	-0,453	0,187	0,264	-0,524	0,200
MIG	-0,304	0,328	-0,189	0,243	-0,486	-0,225	-0,068	0,736	0,285	0,600	-0,474	-0,447	0,064	-0,029	-0,566	0,350
MIP-1 $\alpha$	-0,063	0,092	-0,161	-0,035	0,657	-0,118	0,055	0,495	-0,136	0,273	-0,482	-0,547	-0,095	-0,259	-0,476	0,533
MIP-1 $\beta$	-0,018	-0,166	-0,168	0,230	0,886	0,068	0,358	0,358	-0,218	0,176	-0,468	-0,532	-0,029	-0,326	-0,196	0,500
MIP-1 $\delta$	-0,167	0,143	-0,357	0,175	0,429	-0,365	-0,077	0,622	-0,145	0,442	-0,412	-0,494	0,029	-0,018	-0,767	0,383
RANTES	-0,004	0,055	-0,489	-0,019	0,257	-0,468	-0,282	0,165	-0,327	0,503	0,117	0,250	-0,011	-0,568	-0,287	0,200
TGF- $\beta$ 1	-0,176	0,257	-0,119	-0,011	0,143	-0,250	-0,055	0,662	0,333	0,709	-0,426	-0,253	0,182	-0,032	-0,294	0,083

Tab. 16 **Přehled zprůměrovaných hladin detekovaných cytokinů (vyjádřeno v % pozitivní kontroly), včetně normality dat (šikmost, špičatost).**

	N (počet měření)	Průměr [% pozitivní kontroly)	Střední chyba průměru (SEM)	Medián	Šikmost	p-hodnota (šikmost)	Špičatost	p-hodnota (špičatost)
<b>EOTAXIN</b>	22	1,248	0,198	0,748	0,907	0,065	-0,333	0,727
<b>EOTAXIN-2</b>	23	9,241	1,282	7,805	1,507	0,002	2,770	0,003
<b>GCSF</b>	21	0,985	0,356	0,270	2,414	0,000	5,228	0,000
<b>GM-CSF</b>	21	2,672	0,818	0,875	2,123	0,000	3,787	0,000
<b>I-309</b>	21	2,737	0,549	1,770	1,103	0,028	-0,120	0,902
<b>ICAM-1</b>	21	10,400	2,141	7,060	1,756	0,000	3,696	0,000
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	23	2,139	0,340	1,360	0,946	0,049	0,026	0,978
<b>IL-10</b>	21	7,722	0,765	6,835	0,566	0,259	-0,932	0,338
<b>IL-11</b>	21	1,558	0,280	0,965	1,142	0,023	-0,118	0,903
<b>IL-12p40</b>	21	1,576	0,212	1,340	0,877	0,080	0,266	0,785
<b>IL-12p70</b>	21	0,975	0,199	0,525	1,258	0,012	0,463	0,634
<b>IL-13</b>	21	1,118	0,248	0,510	1,477	0,003	0,981	0,313
<b>IL-15</b>	21	1,429	0,297	0,640	1,101	0,028	-0,299	0,758
<b>IL-16</b>	22	15,960	1,788	14,993	0,713	0,146	0,934	0,327
<b>IL-17</b>	21	0,572	0,086	0,390	1,313	0,009	1,305	0,179
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	23	2,688	0,553	1,230	1,233	0,010	-0,044	0,963
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	22	1,510	0,274	1,215	1,927	0,000	4,738	0,000
<b>IL-2</b>	21	1,080	0,212	0,620	1,452	0,004	1,653	0,089
<b>IL-3</b>	22	7,498	1,123	5,455	1,017	0,038	0,588	0,537
<b>IL-4</b>	22	0,648	0,095	0,450	1,216	0,013	0,145	0,879
<b>IL-6</b>	23	3,740	1,092	1,350	2,010	0,000	3,404	0,000
<b>IL-6sR</b>	22	6,875	0,984	6,260	1,359	0,006	2,843	0,003
<b>IL-7</b>	17	0,444	0,089	0,285	1,001	0,069	-0,345	0,746
<b>IL-8</b>	23	90,933	4,317	91,890	-0,566	0,240	0,348	0,710
<b>IP-10</b>	22	5,117	0,918	4,135	1,507	0,002	1,982	0,038
<b>MCP-1</b>	22	56,079	7,980	55,015	0,070	0,887	-0,979	0,304
<b>MCP-2</b>	21	2,048	0,633	1,335	3,073	0,000	10,766	0,000
<b>M-CSF</b>	22	5,464	0,827	3,928	1,100	0,025	0,454	0,634
<b>MIG</b>	21	0,891	0,171	0,445	1,081	0,031	-0,343	0,724
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	22	4,249	0,703	3,048	0,995	0,043	0,118	0,902
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	22	31,781	3,186	31,363	-0,040	0,934	-0,275	0,773
<b>MIP-1<math>\delta</math></b>	23	1,772	0,238	1,335	0,629	0,191	-0,947	0,311
<b>PDGF</b>	21	17,382	2,864	15,580	0,517	0,302	-1,251	0,198
<b>RANTES</b>	23	77,109	6,993	81,895	-0,783	0,104	0,658	0,482
<b>sTNF RI</b>	22	2,888	0,574	2,218	2,208	0,000	5,553	0,000
<b>sTNF RII</b>	22	9,645	1,762	7,450	1,731	0,000	2,847	0,003
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	21	4,837	0,644	3,270	0,654	0,192	-1,244	0,200
<b>TIMP-2</b>	23	17,998	3,159	12,985	1,713	0,000	2,901	0,002
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	22	5,797	0,832	4,283	0,728	0,138	-0,954	0,317
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	21	2,457	0,390	1,380	0,763	0,128	-1,004	0,302

Tab. 17 **Přehled výsledků proliferace lymfocytů po stimulaci solemi kovů (vyjádřeno jako stimulační index, SI), včetně normality dat (šikmost, špičatost).** Označení „1“ udává hodnotu SI z testu proliferace lymfocytů před 12 lety a „2“ hodnotu SI po posledním testu proliferace.

	N (počet měření)	Průměr [stimulační index, SI]	Střední chyba průměru (SEM)	Medián	Šikmost	p-hodnota (šikmost)	Špičatost	p-hodnota (špičatost)
PWM1	21	82,145	18,326	56,350	2,147	0,000	4,569	0,000
PWM2	22	253,524	52,560	160,612	1,098	0,025	-0,032	0,973
Hg1	19	16,449	5,114	5,210	1,681	0,001	2,084	0,040
Hg2	22	4,085	1,744	1,640	4,179	0,000	18,514	0,000
Thio1	16	0,938	0,201	0,640	1,390	0,014	1,666	0,127
Thio2	2	0,600	0,290	0,600	-	-	-	-
Ag1	19	2,125	1,029	1,150	4,009	0,000	16,779	0,000
Ag2	21	1,308	0,244	1,030	1,688	0,001	2,515	0,010
Al1	16	2,433	0,763	1,275	2,250	0,000	5,384	0,000
Al2	16	2,082	1,071	0,770	3,667	0,000	13,988	0,000
Au1	21	2,200	0,709	1,310	3,998	0,000	17,135	0,000
Au2	20	9,435	3,160	4,645	2,154	0,000	3,874	0,000
Cd1	20	3,518	0,893	1,620	1,656	0,001	2,050	0,039
Cd2	6	5,403	4,680	0,720	2,448	0,004	5,996	0,001
Co1	20	2,783	1,409	0,665	2,879	0,000	7,254	0,000
Co2	18	1,578	0,559	0,885	3,352	0,000	12,230	0,000
Cr1	18	1,438	0,344	1,030	3,056	0,000	10,938	0,000
Cr2	17	1,241	0,237	0,970	1,899	0,001	4,602	0,000
Cu1	18	1,177	0,357	0,705	2,300	0,000	4,467	0,000
Cu2	17	3,028	1,253	1,090	2,497	0,000	5,050	0,000
Fe1	16	3,564	1,767	1,650	3,799	0,000	14,818	0,000
Fe2	14	1,000	0,194	0,962	1,087	0,069	2,042	0,077
Mo1	14	2,606	0,853	1,365	2,628	0,000	7,580	0,000
Mo2	15	12,741	11,707	0,950	3,872	0,000	14,994	0,000
Ni1	21	11,085	3,042	4,660	2,576	0,000	8,261	0,000
Ni2	22	6,815	2,453	1,960	2,916	0,000	8,921	0,000
Pd1	19	3,994	1,896	1,350	3,828	0,000	15,501	0,000
Pd2	18	12,310	10,057	0,900	4,184	0,000	17,634	0,000
Pt1	19	1,710	0,327	1,240	0,845	0,106	0,080	0,937
Pt2	16	4,465	3,551	0,881	3,991	0,000	15,950	0,000
Sn1	18	1,391	0,238	1,150	1,096	0,041	0,614	0,554
Sn2	20	1,079	0,216	0,915	2,367	0,000	7,109	0,000
TiO2_1	13	2,196	0,508	1,590	1,498	0,015	1,401	0,239
TiO2_2	19	0,972	0,150	1,014	1,117	0,033	1,580	0,119
Zn1	12	1,115	0,226	1,005	1,198	0,060	1,546	0,209
Zn2	16	1,512	0,280	1,150	1,491	0,008	2,108	0,053