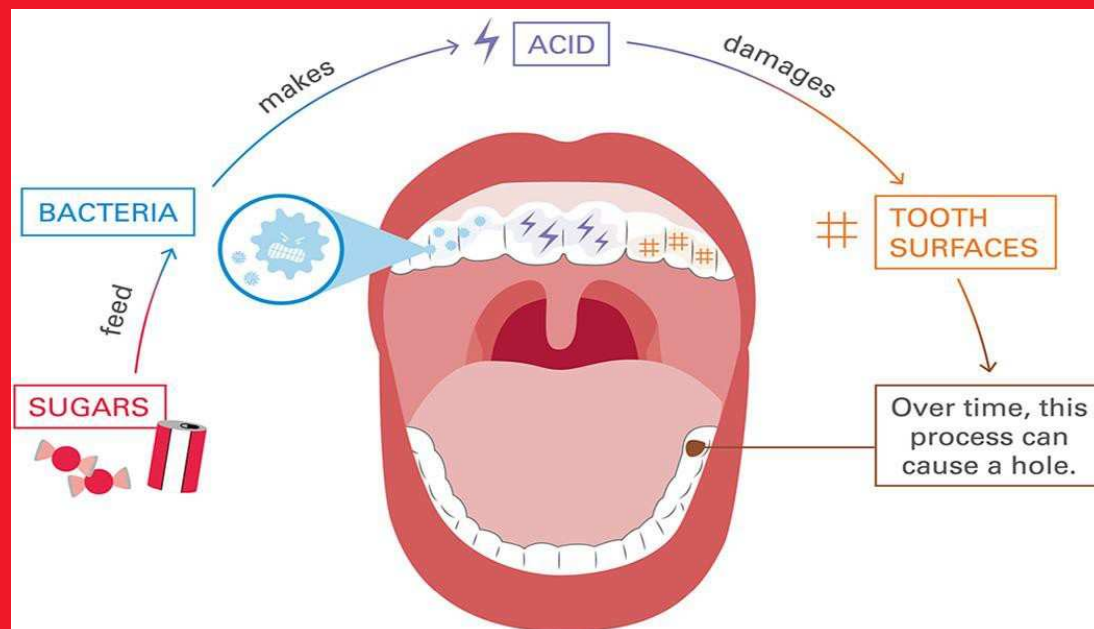


Molekulárně biologická analýza orálních patogenů a slin, zubní kaz

Témata

- Faktory podílející se na vzniku zubního kazu
- Molekulární analýza sliny
- Molekulární analýza orálního mikrobiomu
- Genetika zubního kazu
 - Genetické asociační studie ve vztahu k zubnímu kazu

Zubní kaz a faktory přispívající k jeho vzniku



Zubní kaz jako onemocnění



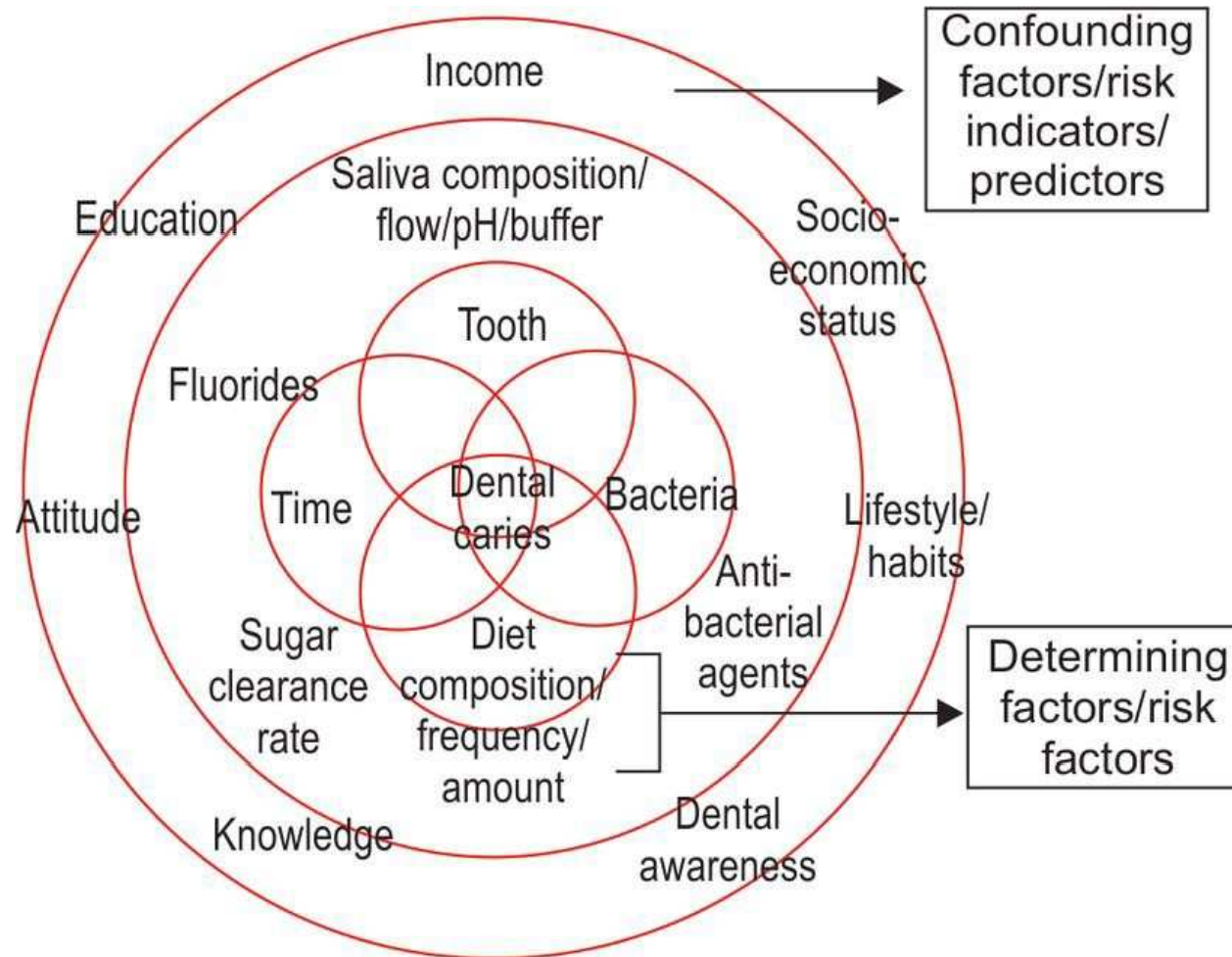
Puwadol Jaturawutthichai
(www.shutterstock.com)

- nejrozšířenější chronické onemocnění
 - 3,5 miliardy lidí (530 milionu dětí, dle WHO)
- Infekční → *transmissible or non-communicable???*
 - přenos bakterií (např. z matky na dítě slinou při olíznutím dudlíku)
- komplexní
 - multigenní, multifaktoriální (faktory endogenní a exogenní)
- na výsledném vzniku se podílí souhra více faktorů
 - složení **orální mikróflory** (hlavní faktor)
 - vlastnosti skloviny a dentinu (kvalita povrchu zubu)
 - složení a fyzikální působení sliny
 - genetické predispozice celkový zdravotní stav (poruchy imun. systému, systémová onem. ovlivňující IS)
 - behaviorální a environmentální faktory
 - čas – doba po kterou faktory působí/spolupůsobí

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699/>

MUNI
MED

Zubní kaz



Diagrammatic representation of the determining (risk factors) and confounding factors (risk indicators/predictors) in dental caries disease.

Zubní kaz

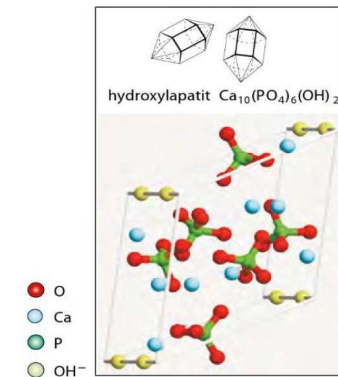
– caries dentium

porušen dynamický proces cyklického střídání demineralizace a re-mineralizace zubní skloviny → ↑ demineralizace → tvorba zubního kazu



Puwadol Jaturawutthichai
(www.shutterstock.com)

- sklovina → kolem 97 % anorganické hmoty (apatit – kationtová komplexní sloučenina = **ligandy** Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{2-}$ + **proti-aniony** → $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ (karbonátapatit), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hydroxyapatit), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ (fluorapatit)
- organické kyseliny (bakterie, strava) → neutralizace aniontů apatitů → rozpad krystalové jednotky → rozpouštění minerální složky skloviny → vznik kazu



Color Atlas of Biochemistry
(3rd edition, 2013)

- proteolytické enzymy bakterií → odbourávání organické složky (kolageny, proteoglykany)
- kaz → dentin → dentinové kanálky → zubní dřev → zánět dřevě (pulpitida), ozubice (periodontitida)

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Slina:

– komplexní karioprotektivní faktor

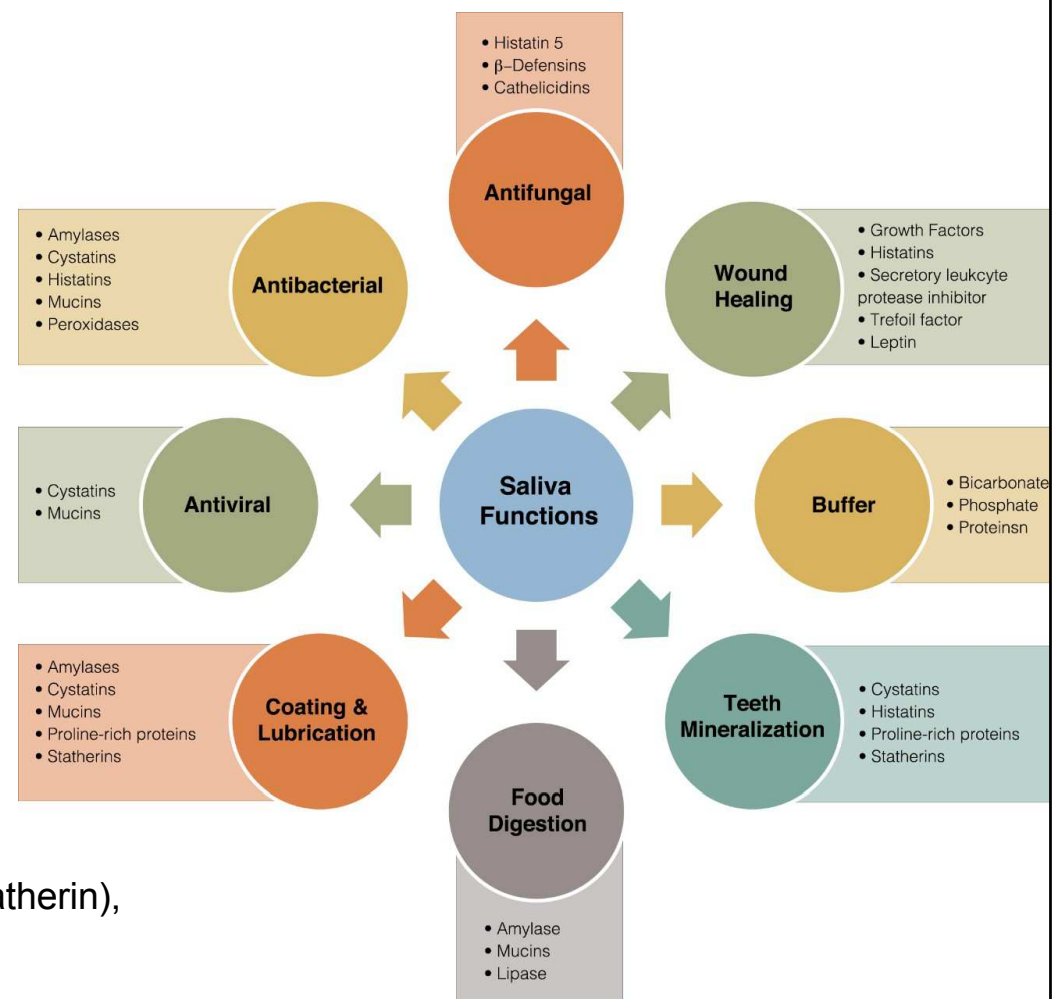
– udržování homeostázy

– fyzikální faktor

průtok slin (omývání a lubrikace tkání dutiny ústní),
orální clearance (odmývání škodlivých látek,
nepřisedlých mikroorganismů)

– „chemický“ faktor

gustin (karbonická anhydráza VI → pufovací kapacita),
vápenaté, fosfátové, fluoridové ionty,
lysozym, laktoferin,
proteiny specifické (IgA, IgG)
a nespecifické imunity (defensiny, katelicidiny, histatiny, statherin),
proteiny bohaté na prolin (PRPs),
muciny



Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Slina:

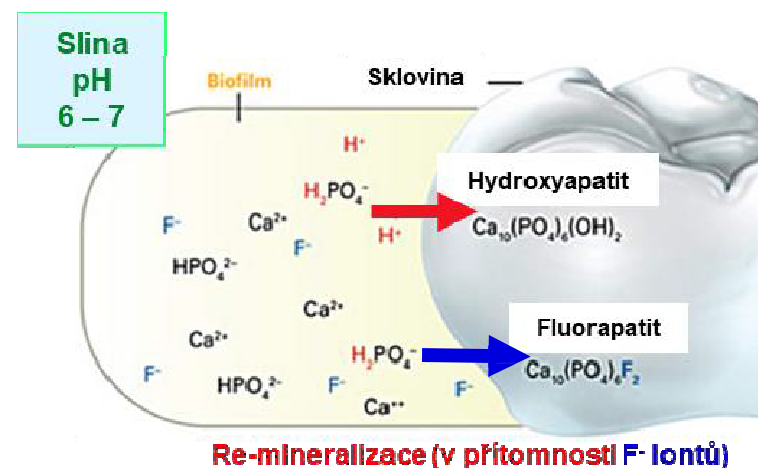
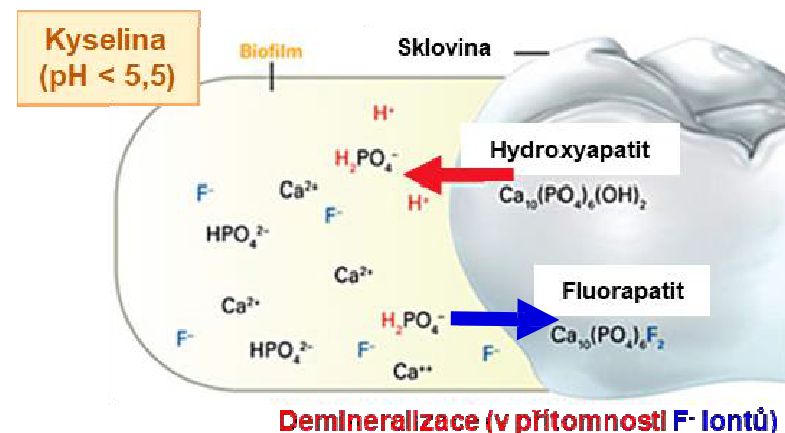
– působení sliny:

- ↑ rovnováha mezi re- a demineralizací
- ↓ zbytky potravy, ↓ mikroorganismy,
↓ kyselost prostředí (ředění, pufrovací systémy
– bikarbonát, hydrogenfosfát, proteiny)
- ↑ látky s antibakteriálními, antimykotickými
a antivirovými vlastnostmi

– **problém** → **snížená tvorba slin**

- ← dehydratace, úzkostné stavy, obstrukce/hypofunkce slinných žláz (DM, Sjögrenův syndrom, AIDS, tumory a jejich léčba, akutní infekce)
- ← léky (beta blokátory, antidepresiva, antihistaminika)
- ← drogy (metamfetamin, THC)

→ podpora **vzniku zubního kazu**



MUNI
MED

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Orální mikrobiom:

– dutina ústní → unikátní mikrobiologický habitat → separátní ekologické niky (ne/deskvamující povrchy, slina) → kolonizace specifickými druhy mikroorganismů

– druhý nejrozmanitější (až 1000 druhů mikroorganismů)
→ udržování homeostázy (kompetice a vytěsňování exogenních patogenů pro zachování stability ekosystému)
→ modulace imunitního systému

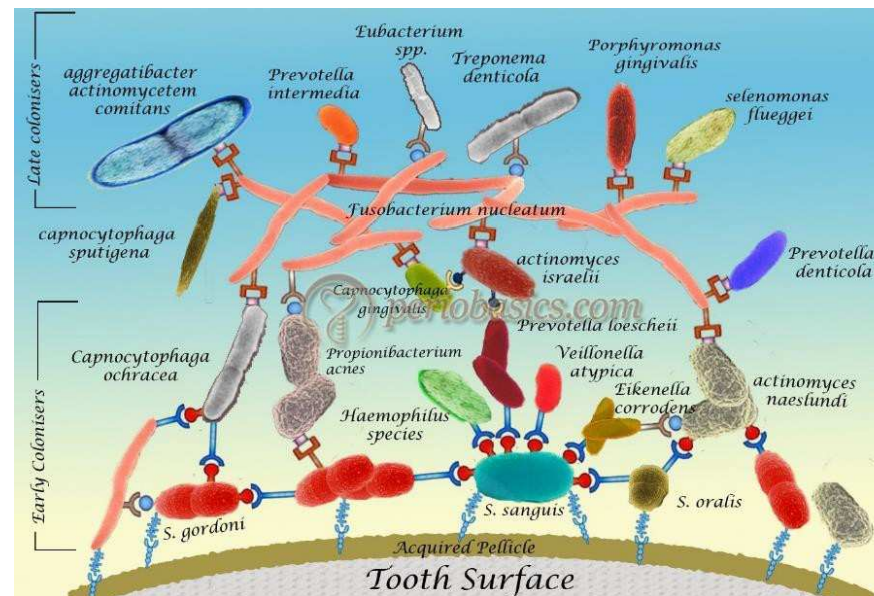
– **dentální plak** = mikrobiální biofilm

→ matrix z extracelulárních polymerních látek (EPS)

→ aerobní bakterie (*Streptococcus sanguinis*), fakultativně anaerobní bakterie (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus* sp.), anaerobní bakterie (*Actinomyces* sp., *Veillonella* sp.), plísně (*Candida* sp.)

– **pelikula** (získaná kutikula)

→ slina → proteiny s povrchovým nábojem (kyselé PRPs, statherin, histatiny) → el.stat. interakce s fosfátovými a vápenatými ionty apatitu → vznik acelulární pelikuly (muciny, cystatiny, albumin, IgA, IgG, lysozym, alfa-amyláza, cukry, neutrální lipidy, fosfo- a glykolipidy, glukosyltransferáza) → ochrana před demineralizací a částečně před adhezí mikroorganismů (proteiny na površích jsou zároveň i ve slině) → kompetice bakteriálních vazebných receptorů → substrát pro bakterie → formace biofilmu



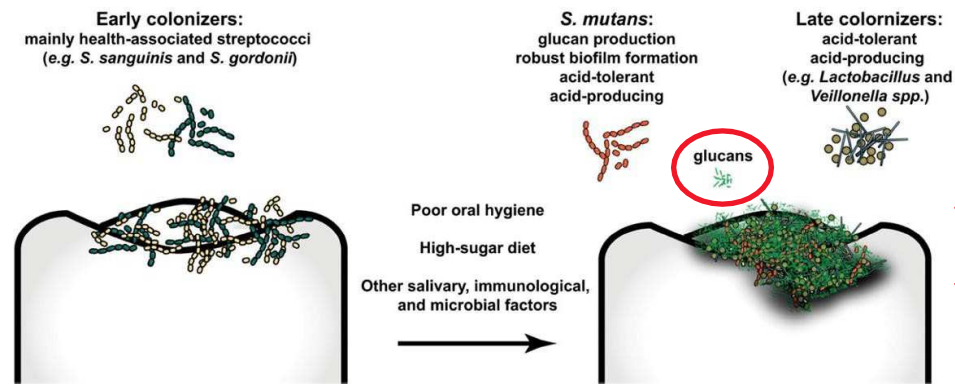
<https://periobasics.com/dental-plaque/>

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Dentální plak

– problém: dysbióza orálního mikrobiom

→ porušení homeostázy → posun z eubiotické rovnováhy od mutualismu/komensalismu k nevyváženému parazitickému/patogennímu stavu → podpora vzniku a rozvoje onemocnění (polymikrobiální)



<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03323>

– dentální plak → převaha kariogenních druhů (fermentují sacharidy na org. kyseliny + tolerují prostředí s nízkým pH) → nejčastější *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* sp., *Candida* sp.

– faktory podporující převahu kariogenních druhů

→ ↑ přijímané cukry/kyseliny → okyselování, ↓ imunita, zánět, ...

→ ↓ slina, ↓ orální hygiena → nárůst tloušťky plaku

→ ↑ plak → nedostatek kyslíku → ↑ anaerobní metabolismus → metabolizace fermentabilních sacharidů → organické kyseliny → ↓ pH → demineralizace

→ ↑ plak → chrání kariogenní bakterie před obrannými mechanismy hostitele

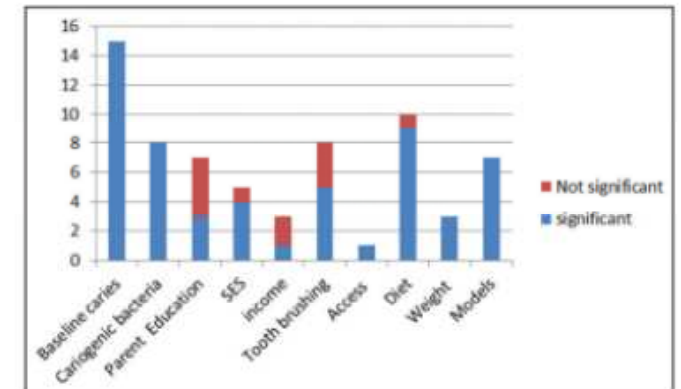
S. mutans → dextran (α -1,6-D-glukan) → extracelulární nerozpustný polysacharid → ↑ ochrana bakterií proti vlivům prostředí (nízké pH, antimikrobiální faktory), ↑ koadheze dalších druhů, ↑ přilnavost plaku

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

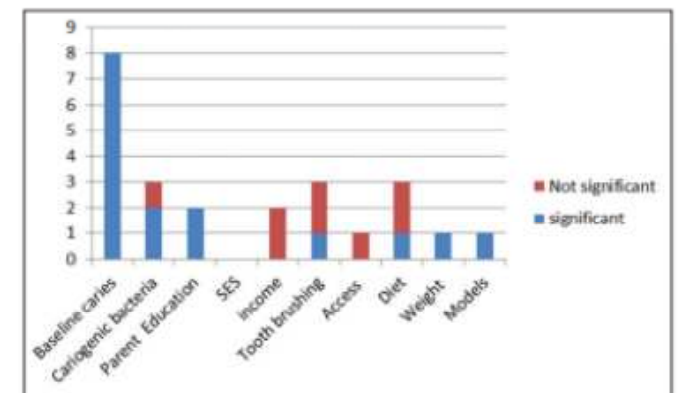
– Externí faktory:

- nedostatečná orální hygiena
- nevhodné stravovací návyky (nadměrný příjem fermentovatelných sacharidů)
- kouření (e-cigarety – náplň má vysoký obsah cukru)
- požívání alkoholu
- léky (poškozen funkce slinných žláz, okyselující dutinu ústní, antibiotika)
- nemožnost přístupu ke kvalitní stravě, pitné vodě, hygienickým potřebám, lékařské péči

– Čas



Graph 2: The proportion of significance of caries predictors in very high human development countries.



Graph 3: The proportion of significance of caries predictors in not very high human development countries.

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Genetické predispozice:

– komplexní onemocnění (genetické, epigenetické a exogenní faktory)

- polygenní
- genetická heterogenita – heterogenita genů ležících na různých lokusech (lokusová), heterogenita uvnitř jednoho genu (alelická)
- neúplná penetrance – ne u všech jedinců dochází k manifestaci patologického fenotypu (další příznivě působící alely, příznivý vliv exogenních faktorů)
- fenokopie (patologický fenotyp i u jedinců, kteří nemají sadu patologických alel)
- vysoká frekvence patologických alel v populaci
- etnická variabilita (odpovědné geny se mohou lišit, varianty genů mají v různých populacích různý vliv na fenotyp)

→ lze určit pouze geny (alely), které zvyšují míru rizika onemocnění (risk factors) → predispozice
(**predisponující genotyp může zvyšovat pravděpodobnost onemocnění**, nicméně nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost)

MUNI
MED

Molekulární analýza sliny

(Salivaomika)

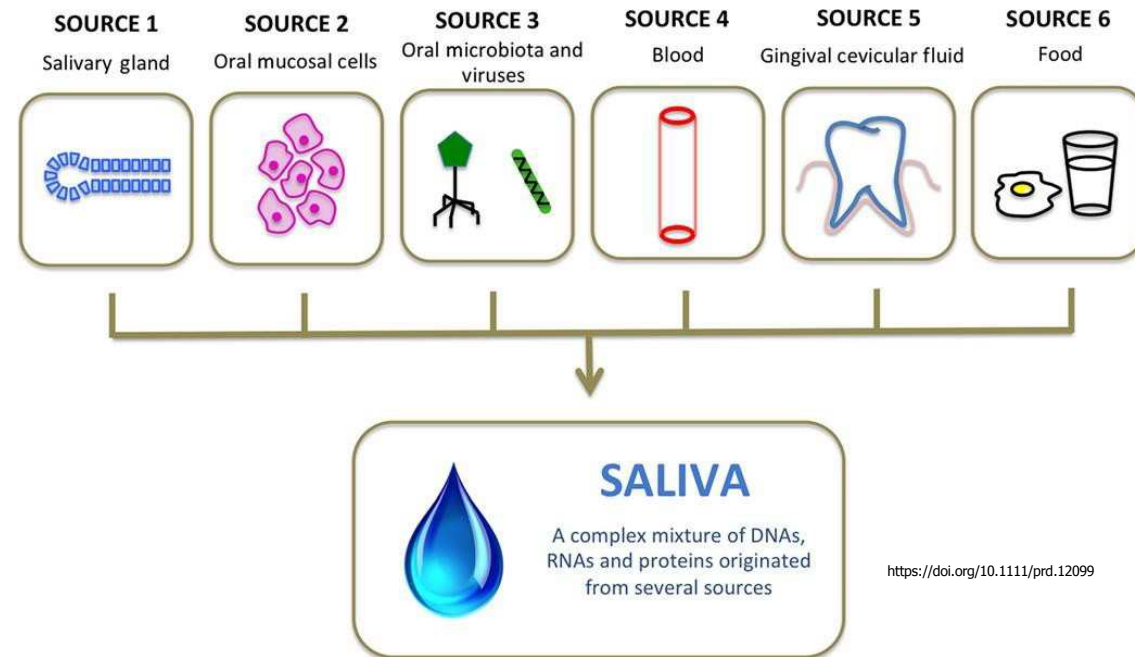


Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

- bohatý rezervoár peptidů, proteinů a NK
- složky slin se prokazatelně mění v reakci na určitá onemocnění a stavy
- více než 100 molekul detekovaných ve vzorcích slin je hodnoceno jako potenciální diagnostické nebo prognostické biomarkery pro různá onemocnění (např. zubní kaz, parodontitida, rakovina, cukrovka)

Saliva is composed of biomolecules and fluids from different sources. Saliva is mainly secreted by salivary glands, and its informative biomolecules (DNA, RNA, proteins, metabolites and microbiota) are obtained from salivary glands, oral mucosa cells, oral microbiota and gingival crevicular fluid.



Molekulární analýza sliny

The different and complementary components of salivaomics

– Slina jako diagnostické medium

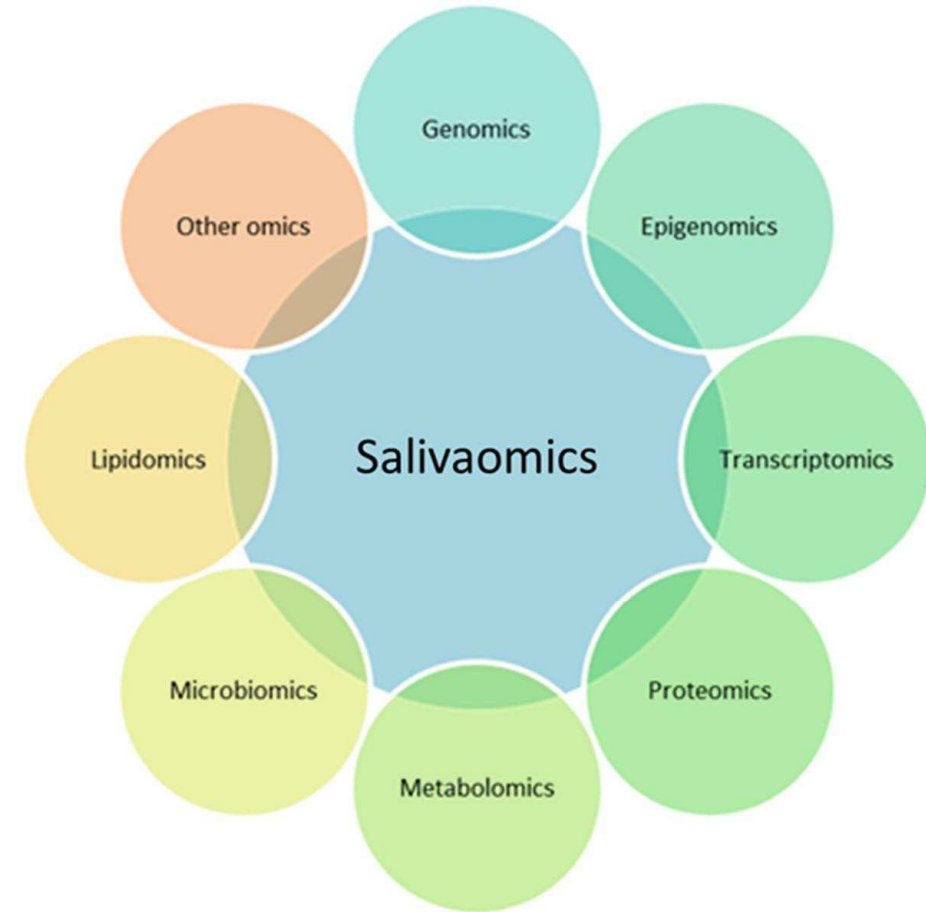
– Salivaomika

→ pojem zaveden 2008

→ spojuje znalosti o různých „omických“ složkách sliny
(proteom, transkriptom, metabolom, mikrobiom, ...)

→ využívá high-throughput technologie (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, lipidomika a mikrobiomika, ...)

→ analýza sliny → **identifikace biomarkerů**



https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9_4

MUNI
MED

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Výhody:

- odběr neinvazivní, snadný, bezbolestný, opakovatelný (trvalá dostupnost materiálu), i nevyškolený personál, lze u všech věkových kategorií
- vzorek o velkém objemu, stabilní v čase, zpracování rychlé, levné
- potenciál nahradit krev při screeningu, diagnostice a prognóze onemocnění

Table 1. Description of Human Saliva Collection Methods.

Type of Whole Mouth Fluid	Method of Collection and Type of Collection Device
Whole Saliva (WS)	Patients should refrain from eating, drinking, and oral hygiene procedures for at least 1 h before saliva collection. (Optimum collection time is 8–10 a.m.). Before collection perform a 1 min oral rinse with distilled water and then after 5 min collect ~5 mL of saliva. Collected sample must be processed in the laboratory within 1 h.
Unstimulated Whole Saliva (USWS)	Passive drooling: In this method restrict oral movement and drain saliva from the lower lip into a plastic vial. Spitting method: Instruct subject to spit into a collection vial. In this method 14 times more bacterial contamination is introduced into the sample.
Stimulated Whole Saliva (SWS)	For the stimulation of glands, chewing different things like natural gum, a piece of paraffin wax, citric acids, and powdered drink crystals have been used.
Parotid Gland	Method introduced by Carlson and Crittenden (1910). In this method a double chambered metallic cup with two outlet tubes is used. One end holds the cup in place using vacuum suction. The second half acts as a collection vehicle for saliva. Specimen collection can be enhanced by smearing citric acid (10%; 1 mL) on the dorsum of tongue every 30 s. Discard the first 1.5 mL of saliva prior to sample collection.
Submandibular/Sublingual Gland	Truelove, Bixler, and Merrit (1967) used a "V"-shaped collector. This method is similar to that for parotid gland collection, but in this case the initial 2 mL is discarded.
Minor Glands	Kutscher <i>et al.</i> (1967) used capillary tubes for collecting saliva from minor glands located at the everted surface of the lower lips.

<https://doi.org/10.3390/ijms17060846>

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008058>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Limitace:

– korelace hladin biomarkerů sérum/slina

↓↓↓ koncentrace analytů v porovnání se sérem → ↑ objem vzorku slin, detekční limit metody, deplece abundantních proteinů (PRPs, α-amyláza, albumin, muciny and sekreční IgA mohou tvořit až 80 %), osmolalita

– vysoká variabilita → horší reprodukovatelnost výsledků

- technická (odběr, zpracování, použitá metoda)
- inter- (věk, pohlaví, fyziologický stav) a intraindividuální (cirkadiánní, cirkanuální)
- biologická (vliv stavu dutiny ústní, cirkadiánní rytmus, systémová onemocnění (Sjögrenův syndrom), léčiva, chemo/radioterapie) → objem a složení slin
- rychlost a stimulace toku slin → koncentrace slinných biomarkerů
- proteolytické enzymy (mikrobiom/hostitel) → stabilita určitých biomarkerů

– otázka standardizace

- vztažení proteinových markerů k celkovému proteinu sliny (stejná osoba jako vzorek i kontrola)
- standardizace používaných metod, validace protokolů
- zohlednění všech proměnných (variabilita složení, místo odběru, rychlost toku, objem vzorku, stimulace, kontaminace krví, odběrové soupravy, integrita analytu)

→ otázka validace biomarkerů pro klinické aplikace

- **verifikace** → stanovení biomarkeru různými technikami, dosažení podobných výsledků
- **validace** → preklinická → definitivní akademická (prospektivní odběr vzorků, retrospektivní evaluace) → multicentrické studie

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Spektrofotometrické metody

- UV/Vis spektrofotometrie
(enzymy, metabolity, proteiny, anti/oxidanty)
- Atomová absorpční/emisní spektrometrie
(elementární atomy a ionty – Ca, Mg, Cr, Mn, Ni, Pb / Na, K)
- NIR (near infrared) spektroskopie
(ionty přechodných kovů a kovů vzácných zemin, molekuly obsahující vazby C-H, N-H, S-H, O-H – thyokyanát, IgA, kortisol, slinná α -amyláza, močovina, fosfáty, celkový protein)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Imunoeseje

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
(přímá, nepřímá nebo sendvičová – adiponektin, kortison, kortizol, C-reaktivní protein, D-dimer, laktoferrin, IgA, IgM, IgG, IgE, myoglobin)
- Chemiluminiscenční imunoesej (kortizol, testosteron, laktát)
- Fluoroimunoesej (slinná α -amyláza, Haptoglobin, C-reaktivní protein)
- Radioimunoesej (kortizol, estradiol, oxytocin)
- Neznačené imunoeseje (nefelometrie, turbidimetrie, imunochromatografie, biosenzory/čipy)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.,
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Tekutá biopsie (liquid biopsy)

- u nádorových onemocnění
- nahrazují tradiční tkáňovou biopsii
- testy detekují:
 - cirkulující nádorové buňky
 - exomy
 - nádorovou DNA, nádorovou RNA a proteiny (šíření do krevního řečiště nebo slin z primární léze)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.,
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

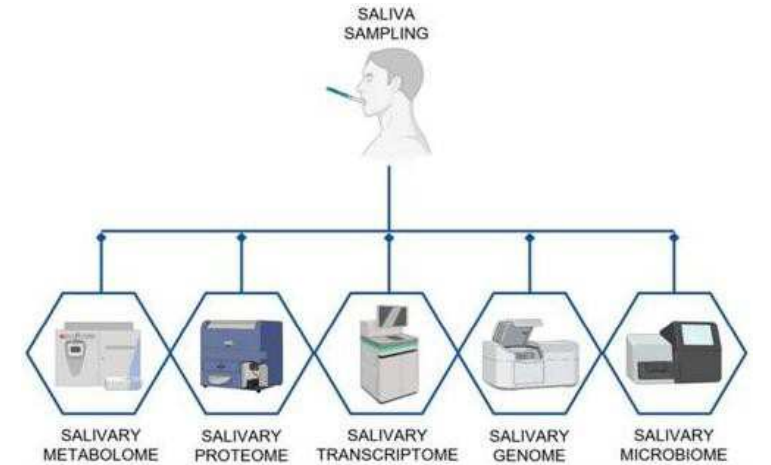
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

Molekulární analýza sliny

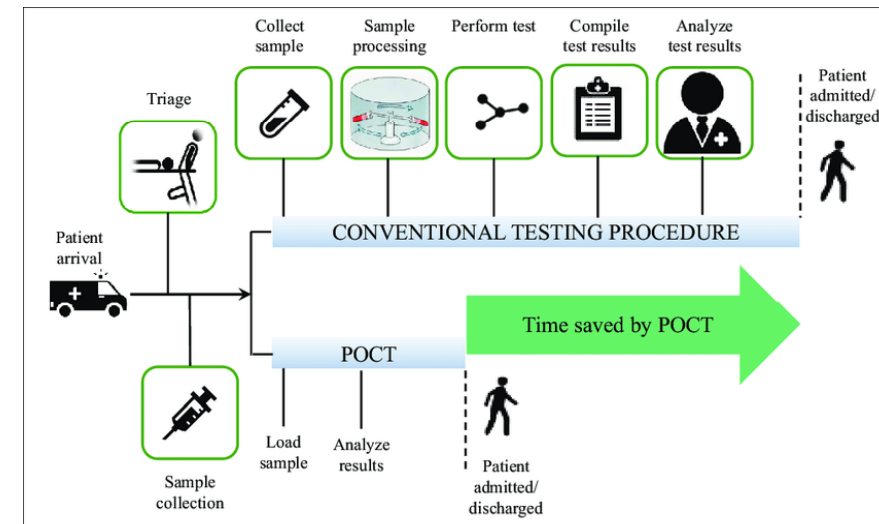
– Slina jako diagnostické medium

„Omiky“

- **DNA** (genomika a epigenomika - rakovina)
- **RNA** (transkriptomika - biomarkery pro chronickou parodontitidu, Sjögrenův syndrom, rakovinu plic, vaječníků, prsu a slinivky)
- **proteiny** (proteomika - Sjögrenův syndrom, Downův syndrom, schizofrenie)
- **metabolity** (metabolomika – rakovina ústní dutiny, hepatocelulární a kolorektální karcinomy, parodontitida, chronické onemocnění ledvin)
- **lipidy a mikrobiom** (lipidomika, mikrobiomika)...
- souběžná analýza stovek analytů → přesná detekce malých změn
- vysoká citlivost, kvantitativní výsledky
- analýza souboru biomarkerů pro dané onemocnění
- zatím žádná v klinické aplikaci → snahy o „**point-of-care**“ testování



<https://doi.org/10.3390/bios11100396>



<https://doi.org/10.1007/978-3-030-37681-9>

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium – zubní kaz
 - žádný diagnostický test
 - testy náchylnosti k zubnímu kazu → mikrobiologická laboratoř
 - stanovení přítomnosti kariogenní mikroflóry
 - kvantitativní určení přítomnosti fermentujících mikroorganismů ve slině
 - stanovení pufrovací kapacity slin a rychlosti sekrece slin
 - kvantifikace kolonií plísně *Candida albicans*
- snahy o vztažení prevalence zubního kazu k fenotypu určeném ze sliny → rozporuplné výsledky

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – náchylnost k zubnímu kazu

– proteinové biomarkery sliny asociované s náchylností ke vzniku zubního kazu:

↑ celkový protein, celková aktivita antioxidantů

↑ alfa-amyláza, muciny (MUC1 a MUC5B)

↓ arginin deiminázový systém, albumin, proteináza 3, PRP1/3, statherin, histatin 1

↓ koncentrace vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů

↓ aktivita ureázy

– proteinové biomarkery sliny asociované s náchylností ke vzniku ECC:

↑ PRPs, histatiny, IgA, IgG

↓ statherin

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – parodontitida, rakovina DÚ

– parodontitida

- ↑ slinné biomarkery – IL-1 β , MMP-8, MMP-9, TNF- α , AST, ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru κ B (RANKL), osteoprotegerin, prostaglandin E₂
 - lze je použít pro detekci počínající parodontitidy, pro rozlišení parodontitidy, gingivitidy a pro predikci progresu parodontitidy a sledování prognózy

→ ↑ bakterie červeného komplexu (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*)

→ ↑ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* (G⁻ anaerobi)

→ genetické predispozice pro náchylnost → **polymorfismus v genu pro IL-1**

– nádory (dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní – OSCC)

→ ↑ slinné biomarkery – IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , CD59, MRP14 (myeloid related protein), profilin 1, kataláza, protein vázající Mac-2 (M2BP)

→ další potenciální markery ve slině → telomeráza, Cyfra21-1, tkáňový polypeptidový antigen, nádorový marker CA 125, CD44, glutathion, transferrin, mRNA (IL8, IL-1 β , fosfatáza DUSP1, hemaglutinin HA3, enzym OAZ1, S100 calcium-binding protein P, acetyltransferáza SAT) některé aminokyseliny, laktát, mimobuněčná DNA, mikroRNA, buňky karcinomu

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

– testovací sady pro ordinace (point-of-care testování, chair-side kits):

– zlepšení individualizované péče

- stanovení rizika vzniku zubního kazu
- riziko nástupu a posouzení progresu parodontitidy
- screeningu rakoviny DÚ

– zubní kaz

- fyzikální parametry: množství, rychlost toku, viskozita, konzistence pH sliny a pufovací kapacita
- laktát
- stanovení kariogenních bakterií *S. mutans* a *Lactobacillus* sp.



komerční kity (stanovení vizuálně, kolorimetricky)

komerční kity (stanovení kolorimetricky)

komerční kity
(kultivační, imunochromatografická detekce antigenů)

**MUNI
MED**

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

– testovací sady pro ordinace (point-of-care testování, chair-side kits):

– parodontitida

- detekce ve slině – aktivní MMP-8 → PerioSafe® PRO DRS (imunochromatografie) a ORALyzer® (analýzátor)
- detekce v tekutině dásňového sulku – aMMP-8 (ImplantSafe DR®), AST (PerioGard, PocketWatch)



– nádor (OSCC) screening

Table S2: Commercially available POC adjuncts for oral cancer examination

POC Device	Company	Principle	Sample	Sensitivity	Approximate cost of analysis	References
Salivary adjuncts						
Oramark/ OncAlert RAPID Test	Vigilant Biosciences, Fort Lauderdale, Florida	Salivary Biomarkers - CD44 and total protein	Saliva	Qualitative	NA	("OncAlert Oral Cancer LAB Test RAPID Test Vigilant Biosciences Vigilant Biosciences," n.d.)
OncoE6™ Oral Test	Arbor Vita Corporation, Fremont, California	HPV viral E6 oncoprotein	Saliva	Qualitative	NA	("Products-CoVisa Arbor Vita Corporation," n.d.)
SaliMark OSCC salivary DNA test	PeriRx LLC, Broomall, Pennsylvania	DNA biomarkers	Saliva	Quantitative	200\$	(<i>SaliMark™ OSCC The Most Clinically-Advanced and Scientifically-Validated Molecular DNA Test for Oral Squamous Cell Carcinoma</i> , n.d.)
The OraRisk® HPV Complete Genotype	(OralDNA Labs, Inc., Eden Prairie, Minnesota	Oral HPV biomarkers	Saliva	Quantitative	200\$	("OralDNA Test Menu OraRisk HPV Complete Genotyping," n.d.)

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
 - parodontitida

Table 2. Examples of biomarker assay kits in the market.

Biomarker Classification	Sampling From	Product Name	Detecting Target	Detecting Principle	Analyzing in
Biochemical assay	GCF	Periocheck	Neutral proteases	Enzymatic digestion reaction (Colorimetric assays)	Chairside
	GCF	PocketWatch	AST	Enzymatic catalysis reaction (Colorimetric assays)	
	GCF	PerioGard	AST	Enzymatic catalysis reaction (Colorimetric assays)	
	Oral rinse	PerioSafe	aMMP-8	Lateral flow test with digital reader (OraLyzer®)	
	GCF	ImplantSafe			
	Oral rinse	SillHa ST-4910	Blood, leukocytes, and protein	Lateral flow test with dual-wavelength reflectometry	

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
 - biomarkery onemocnění

- autoimunitní onemocnění

Sjögrenův syndrom – α -amyláza, karbonická anhydráza VI, laktoferin, β 2-mikroglobulin

- neurodegenerativní onemocnění

Alzheimerova choroba – celkový tau protein, fosforylovaný tau protein, amyloid- β a alfa-synuklein

- genetické onemocnění

cystická fibróza – Ca, PO_4^{2-} , Na, K, Cl, ↓ objem slin, močovina, kyselina močová, prostaglandin E_2

- rakovina

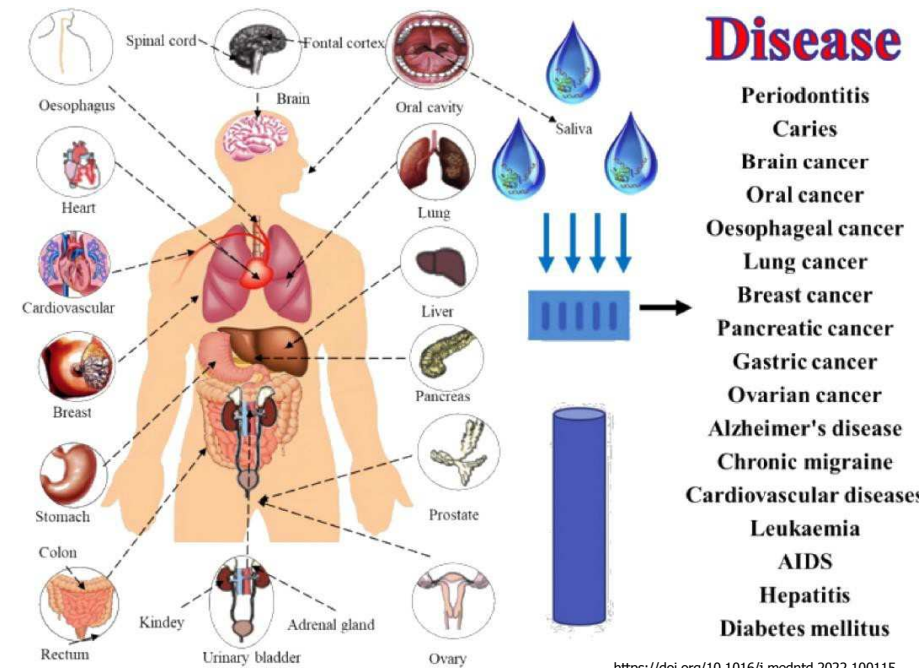
spinocelulární karcinom – IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-1, VEGF, HER2, tissue polypeptide antigen (TPA) and EGFR, LDH, N- α -acetyltransferase 10 protein (Naa10p), carcinoembryonic antigen (CEA) protein, serum basic fibroblast growth factor (bFGF), transferin, cyklin D, Maspin, specifické mRNA

r. prsu - HER2/neu (C-erbB-2), VEGF, EGF, specifické mRNA, autoprotilátky proti HER2 a MUC-1

r. slinivky – transkriptomické markery mRNA (*KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* a *DPM1*), specifické miRNA, laktoperoxidáza, Cyklofilin B, Cytokeratiny (14, 16 a 17)

- alergie

potravinová alergie - IgE a IgG₁



<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

Molekulární analýza sliny

– biomarkery onemocnění

– kardiovaskulární onemocnění

CK-MB, myoglobin, troponin I, myeloperoxidáza, markery zánětu (CRP, TNF- α , MMP-9), markery adheze (rozpuštěný CD40 a ICAM-1)

– metabolismus

diabetes melitus 2. typu – 1,5-anhydroglucitol, CRP, leptin, IL-6, TNF- α

– infekční onemocnění

HIV – protilátky proti HIV

viry – přítomnost protilátek IgM/IgA, virová RNA

Kandidóza, amébiáza – přítomnost *Candida* sp., *Entamoeba histolytica* (protilátky)

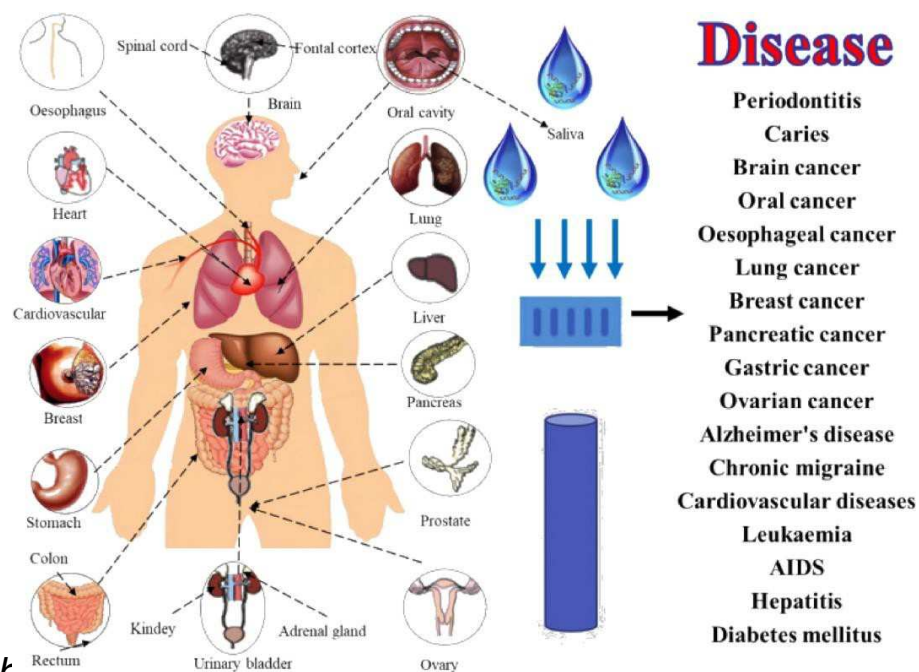
Hepatitida – přítomnost DNA viru HBV

Peptidické vředy, gastritida, – přítomnost *Helicobacter pylori* (IgG protilátky, DNA *H. pylori*)

– hormonální nemoci

Cushingův syndrom a Addisonova choroba – kortizol

pohlavní hormony – syndrom polycystických ovarií, menopauza/andropauza, anovulace, hypogonadismus, hyperestrogenismus



<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

doi:10.7759/cureus.7708

MUNI
MED

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – laboratorní biomarkery

CHOOSING SALIVARY ANALYTES & DNA

HOW TO CHOOSE THE RIGHT SALIVARY BIOMARKER, ANALYTE OR GENETIC MARKER?

As the number of novel biomarkers being studied in saliva continues to increase, choosing a reliable and impact generating salivary biomarker, analyte, or genetic marker can seem daunting. However, Salimetrics is here to help with some basic advice to keep you going. If you need something more in-depth, don't hesitate to request advice. We're always happy to assist.

[REQUEST ADVICE](#)

Biomarker Lab services and facilities

In our Biomarker Lab in Cambridge, we use Salimetrics reagents, antibodies and kits.

Salimetrics is widely regarded as a global leader in salivary bioscience, they lead the field in developing saliva collection methods and assay technology and are trusted around the world to get reliable results.

We routinely analyse the following biomarkers, although others may be available. Please [contact us to discuss](#).

+ Saliva markers

- Aldosterone
- Alpha-Amylase
- Androstenedione
- C-Reactive Protein
- Cortisol
- Cotinine
- DHEA
- DHEA-S
- Secretory Immunoglobulin A (SIgA)
- Testosterone
- Transferrin/ Blood Contamination
- Uric Acid
- Estradiol
- Estriol
- Estrone
- IL-6
- IL-1 β
- Melatonin
- Progesterone
- 17a-OH-progesterone

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
- laboratorní biomarkery

https://www.oraldna.com/trends-in-salivary-testing/index.php/category/periodontal-disease/

Follow OralDNA Labs on Social Media


TRENDS IN SALIVARY TESTING
A Clinician's View of Salivary Testing

HOME ABOUT CONTACT US ADDITIONAL LINKS ORALDNA.COM

Periodontal Disease

MyPerioProgress: Features and How-To Video

Posted on February 5, 2021 by Diane Larson RDH, BSDH



According to Merriam Webster, the definition of a posttest is "a test given to students after completion of an instructional program or segment and often used in conjunction with a pretest to measure their achievement and the effectiveness of the program." When an OralDNA® provider performs a pretest MyPerioPath®, applies periodontal therapy, and then performs a posttest MyPerioPath®, a comparison report called MyPerioProgress® is generated. This can be used to measure the effectiveness of t...

SUBSCRIBE TO BLOG VIA EMAIL

Enter your email address to subscribe to Trends in Salivary Testing and receive notifications of new posts by email.

Email Address

SUBSCRIBE

MORE

Posted in Patient Education, Periodontal Disease, Salivary Diagnostics Tagged bacterial testing, Patient Education, salivary diagnostics

<https://www.oraldna.com/trends-in-salivary-testing/>

Table 2. Examples of Commercially Marketed Oral Fluid Tests^{18, 22-25}

Test (Manufacturer)	Intended Use
23andMe® Health + Ancestry	Detect genetic health risks (e.g., BRCA1/BCRA2 status), carrier status, physical traits, and wellness features
Alert 2™ (OralDNA Labs)	Combine MyPerioPath® and MyPerio ID® IL-6
Celsus One™ (OralDNA Labs)	Evaluate genetic markers related to inflammatory response
DNA DrugMap™ (OralDNA Labs)	Detect drug metabolizer status
Intercept® i2™, Intercept® i2he™, and Intercept® Oral Fluid Drug Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect drugs of abuse (e.g., marijuana, cocaine and opiates)
MyPerio ID® IL-6 or IL-1 (OralDNA Labs)	Detect genetic polymorphisms associated with increased genetic risk for severe periodontal disease
MyPerioPath® (OralDNA Labs)	Evaluate the number and concentration of bacteria implicated in periodontitis
OraMark™ Test (Vigilant Biosciences)	Detect CD44 and total protein associated with oral cancer
OraQuick® In-Home HIV Test, OraQuick® HIV Self Test, and OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect HIV-1 and/or HIV-2 antibodies in oral fluid
OraRisk HPV® (OralDNA Labs)	Screening tool to identify the type(s) of oral HPV present
OraRisk HSV® (OralDNA Labs)	Detect HSV-1 or HSV-2 present in the oral cavity
OraRisk® Candida (OralDNA Labs)	Detect and identifies all common species of <i>Candida</i> present in the oral cavity
OraRisk® CT/NG (OralDNA Labs)	Detect the presence of <i>Chlamydia trachomatis</i> and/or <i>Neisseria gonorrhoea</i> in the oropharynx
OraSure® HIV-1 (OraSure Technologies, Inc.)	Detect HIV-1 antibodies in oral fluid
Q.E.D. Saliva Alcohol Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect alcohol in oral fluid
SaliMark OSCC® (PeriRx, LLC)	Detect increased levels of certain mRNAs associated with increased risk of oral cancer

<https://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/salivary-diagnostics>



MUNI
MED

Molekulární analýza orálního mikrobiomu

“ („Oralom“)



Molekulární analýza OM

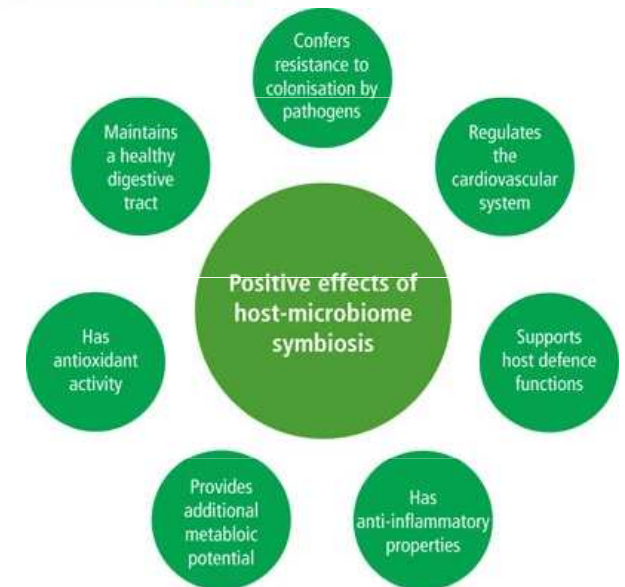
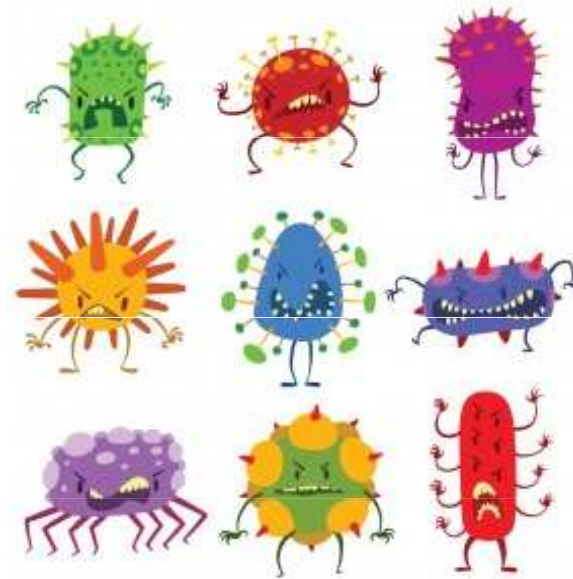
– Orální mikrobiom

- společenství až 1000 různých druhů mikroorganismů
 - bakterie, houby, viry, archea, prvoci
 - bakteriální převaha

– „oralom“

→ souhrnné označení pro dynamické interakce mezi orální mikrobiotou a hostitelem

(Např. orální mikroflóra je důležitá pro dozrávání a vývoj vhodné orální imunitní odpovědi → imunitní systém hostitele se musí bránit před patogenními mikroby, ale zároveň harmonizovat a chránit komenzální orální mikroby)



Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

– dysbióza → onemocnění DÚ

- ← strava hostitele
- ← zánětlivé reakce
- ← systémová onemocnění (DM 2, hyperglykémie)
- ← návyky hostitele (kouření, alkohol, chronický stres)

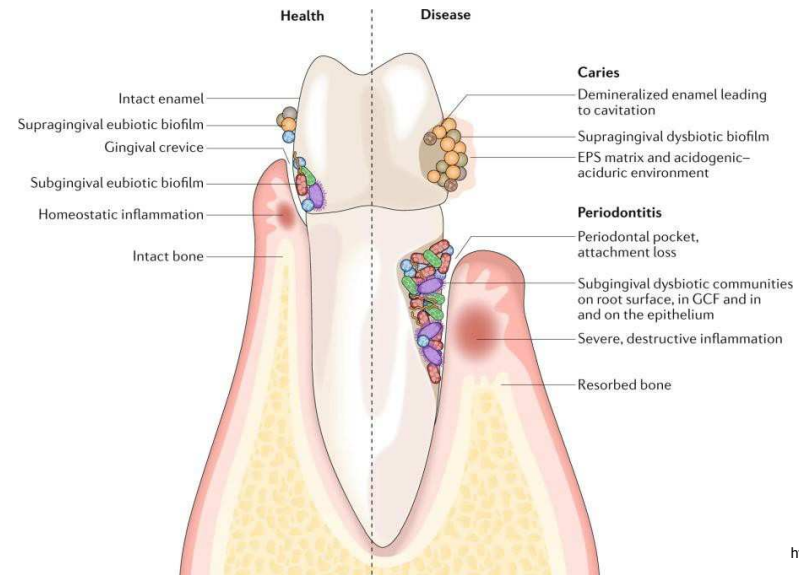
– zubní kaz → ↑ příjem sacharidů ve stravě → ↑ produkce kyselin → ↓ pH a pufrční schopnosti slin → ↑ produkce ECM biofilmu → zakoncentrování kyselin na povrchu skloviny → podpora růstu acidurických a acidogenních druhů → dysbióza

– parodontitida → dysbióza subgingiválních mikrobiálních společenstev (biofilmu) → vytvoření a udržování zánětu gingivy a parodontu → nepříznivý vliv na IS hostitele → zabránění subverzi IS a obnově tkáně

→ určité druhy OM biofilmu → etiologické agens (bakterie červeného komplexu)

→ *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* → vykazují schopnost řídit procesy zapojené do patogeneze onemocnění parodontu tím, že řídí restrukturalizaci mikrobioty a podporují záněť

→ **orální virom** může být v patogenezi onemocnění stejně významný jako orální bakteriom



Microbial colonization occurs on all available surfaces, and microorganisms can also penetrate epithelial tissues and cells. The microbiota assembles into biofilm communities on the abiotic and biotic surfaces. In health (left), eubiotic biofilms maintain a homeostatic balance with the host. In disease (right), caries and periodontitis ensue when biofilms become dysbiotic, resulting in increased levels and duration of low pH challenge and the induction of destructive inflammatory responses, respectively. EPS, extracellular polymeric substance; GCF, gingival crevicular fluid.

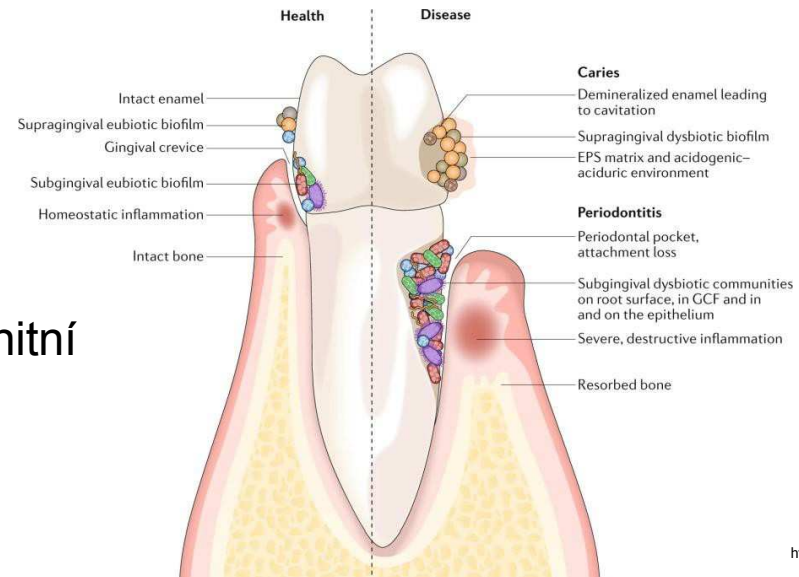
Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

- dysbióza → mikroby DÚ mohou ovlivňovat imunitní odpověď a patogenezi nemoci i mimo DÚ (rezervoár pathobiontů)

→ dutina ústní → vysoká míra vaskularizace, vstupní místo dýchací a trávicí soustavy

- systemová onemocnění → primární mechanismy spojující or. infekci se systemovými patologiemi
 - šíření infekce z dutiny ústní v důsledku přechodné bakteriémie
 - cirkulace mikrobiálních toxinů
 - systemový zánět způsobený nepříznivými imunologickými reakcemi na orální mikroby
- mikroby spojené s DÚ detekovány v mnoha vzdálených orgánech (tenké střevo, plíce, srdce, mozek, placenta) → kolonizace závisí na zdrav.stavu dané tkáně
- prokázána asociace mezi mikroby podílejícími se na parodontitidě a chronickými stavy (kardiovaskulární onemocnění, hypertenze, zánětlivá onemocnění)
 - subgingivální biofilm → zdroj bakterií a prozánětlivých mediátorů → cirkulace



Microbial colonization occurs on all available surfaces, and microorganisms can also penetrate epithelial tissues and cells. The microbiota assembles into biofilm communities on the abiotic and biotic surfaces. In health (left), eubiotic biofilms maintain a homeostatic balance with the host. In disease (right), caries and periodontitis ensue when biofilms become dysbiotic, resulting in increased levels and duration of low pH challenge and the induction of destructive inflammatory responses, respectively. EPS, extracellular polymeric substance; GCF, gingival crevicular fluid.

<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>

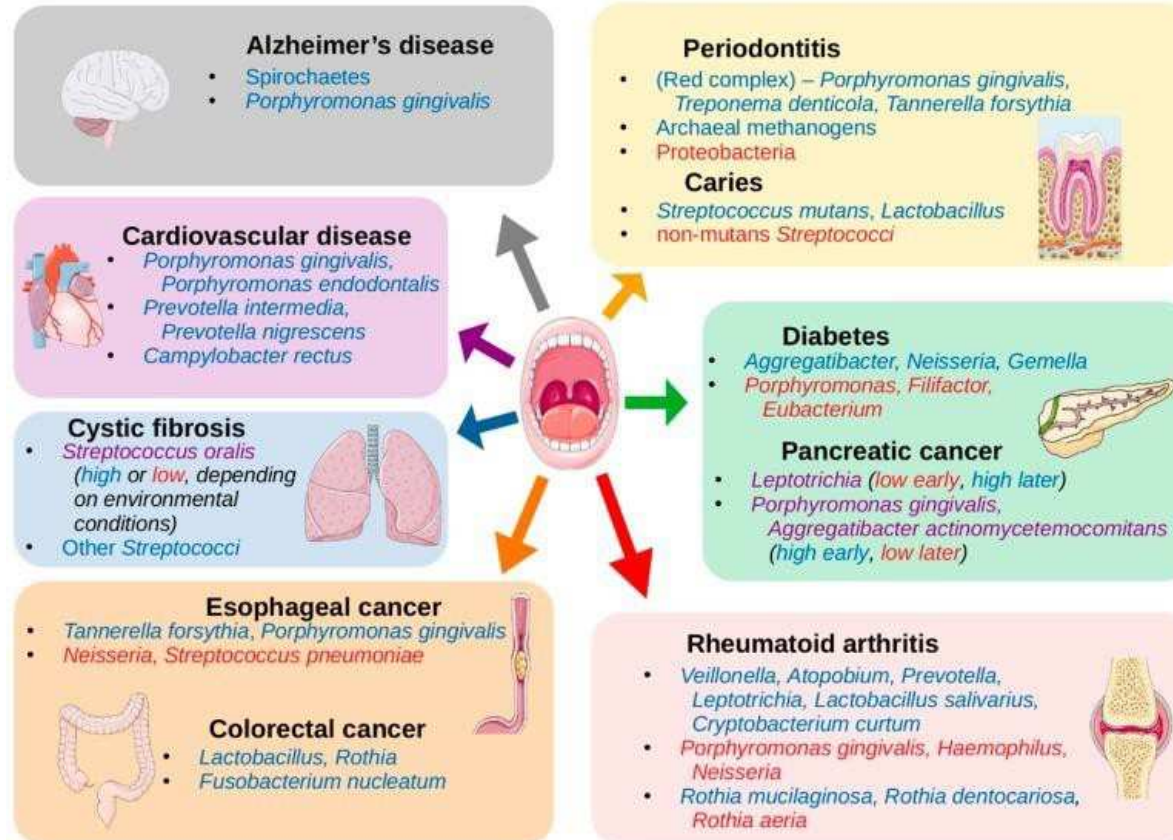
<https://doi.org/10.1111/prd.12393>

MUNI
MED

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – potenciální biomarker systémových onemocnění

ateroskleróza
cholesterol



Individuals with periodontal disease, tooth loss, or oral bacterial infections have an increased risk of developing **gastrointestinal cancers** (*P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), and *Prevotella intermedia*)

cirhóza jater
the microbial source of liver cirrhosis is the **translocation from the oral cavity to the gut.**

HIV

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) is associated with an **increased risk of pancreatic cancer** (Herremans et al., 2022), while the *Leptotrichia* is associated with a reduced risk.

Oral and systemic diseases associated with the oral microbiome. A representation of the associations found between diseases with increases or decreases of the abundances of organisms in the oral cavity. Organisms listed in blue have been shown to be increased in abundance in the oral cavity in individuals presenting with the noted disease, and organisms listed in red have been shown to be decreased. Those in purple may be either increased or decreased depending on the conditions or progression of the disease.

<https://doi.org/10.1111/prd.12393>
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308>

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

Table 1. Host Factors to Modulate the Oral Microbiome.

Factor	Reference
Genetics	- Genetic polymorphism in miRNA202 is involved in hBD1 salivary level as well as caries experience [64]
	- Genes expressed in dental enamel development are associated with molar–incisor hypomineralization [65]
	- GLUT2 and TAS1R2 genotypes individually and in combination are associated with caries risk [66]
	- Host genetic control of the oral microbiome in health and disease [67]
	- Microbial abundance and some aspects of the microbial population structure are influenced by heritable traits in saliva [68]
Immunity	- Immune cell network mediating immune surveillance at oral mucosa and gingiva [69,70]
	- The innate host response in caries and periodontitis [71]
	- Secretory immunity with special reference to the oral cavity [72]
Attachment surface	- Surface properties influence oral biofilm formation [73]
	- Differences in relation to the microbial diversity of modified resins during the initial phase of biofilm maturation [74]
	- Biomaterial-associated infection of implants and devices [46]
Diet	- Vegan diet influences on the human salivary microbiota [75]
	- Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms [76]
Cigarette smoking	- Smoking decreases structural and functional resilience in the subgingival ecosystem [77]
	- Firmicutes were statistically elevated in smokers at the expense of Proteobacteria and Fusobacteria in non-smokers [78]
	- Tobacco smoking affects the salivary gram-positive bacterial population [79]
Alcohol	- Alcohol affects to the oral microbiome composition [80–82]
Oral hygiene	- Toothbrushing frequency is related to the incidence and increment of dental caries [83]
Socioeconomic status	- Socioeconomic factors, such as education and income, are associated with disparities in the prevalence and severity of periodontal disease [84]
	- A strong association between cariogenic bacteria and socioeconomic status was found [85]
	- Differences in socioeconomic status were reflected in the bacterial profile of saliva [86]

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– místo odběru vzorku

→ OM na různých místech dutiny ústní (slina, jazyk, patro, bukální sliznice, povrchy zubů, dásně, supra-/subgingivální plak, mandle, hrdlo) sice vykazuje celkovou podobnost, ale s rozdíly → **ekologické niky**

→ obecný mikrobiální screening pro diagnostiku se provádí ze sliny nebo místně specificky z tekutiny dásňového sulku nebo z dentálního biofilmu

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– mikrobiologické kultivace

- 250 druhů izolováno a charakterizováno
- OM komplexní → některé druhy se dosud nepodařilo kultivovat

– sekvenování z jedné buňky (single-cell sequencing NGS)

- původně vyvinuto pro účely imunitního profilování
- upraveno, aby umožňovalo hodnocení jednotlivých mikrobiálních buněk
- ↑ míru detekce nekultivovatelných organismů

– sekvenace 16S rRNA

- sekvenace konzervovaného genu pro 16S rRNA (bakterie) nebo ITS (internal transcribed spacer) oblasti DNA (plísň)
- nejčastější sekvenční metoda, levná
- pouze taxonomické údaje (omezená rozlišovací schopnost fylogeneticky příbuzných druhů/kmenů)

– celogenomové sekvenování (WGS – whole genome shotgun sequencing)

- DNA je náhodně fragmentována a pak podrobena Sangerovu sekvenování nebo NGS
- nástroj pro metagenomickou analýzu, paralelní hodnocení všech říší (bakterie, plísň, viry) v jednom vzorku
- nejen taxonomické údaje, ale i biologické funkční profily mikrobiální komunity
- evoluční analýza specifických organismů spojených s konkrétní chorobou nebo prostředím

qPCR

- nejen gen pro 16S rRNA, ale také jiné geny, umožňuje také kvantifikaci

genomika

Molekulární analýza OM

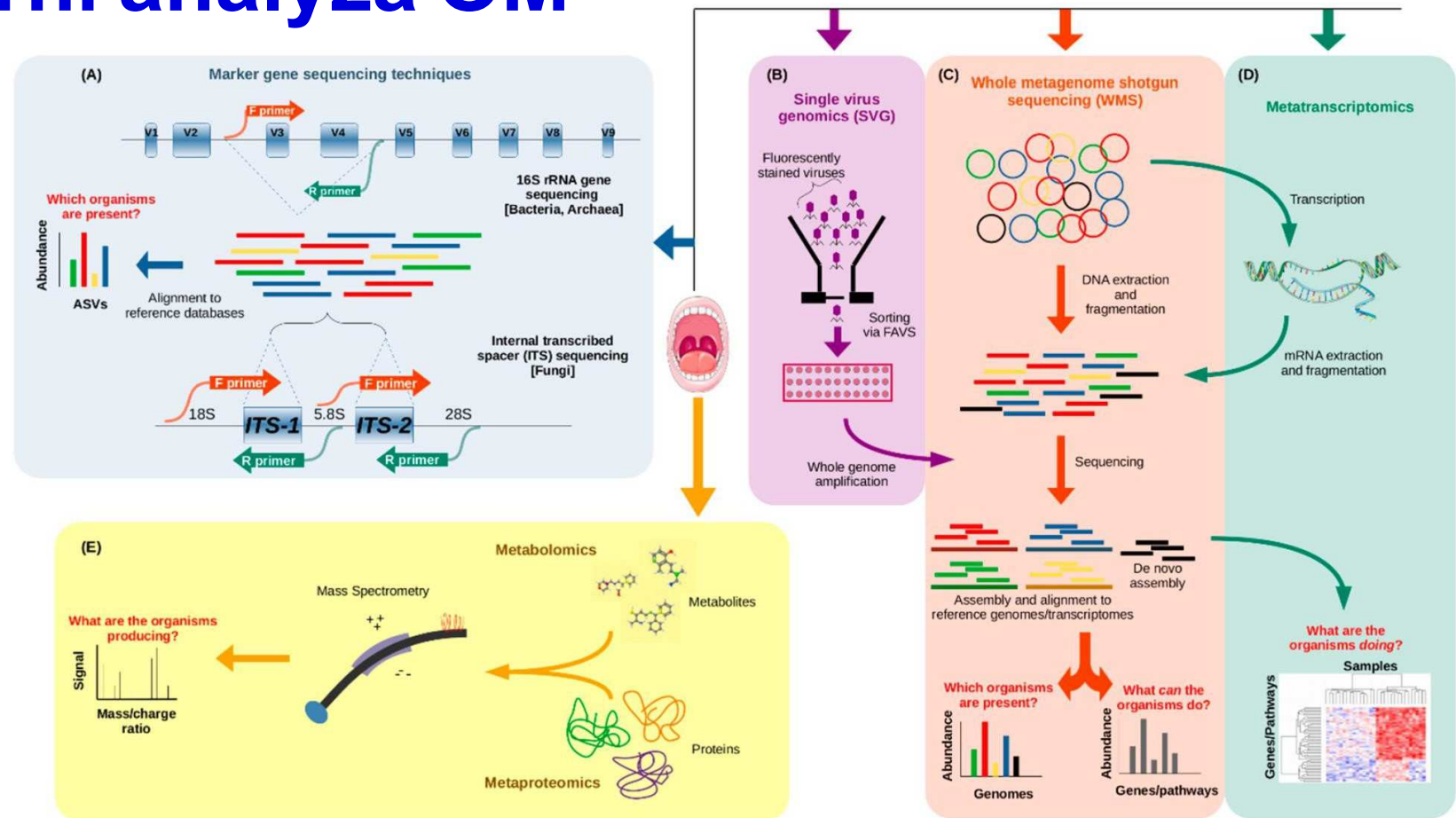
- Orální mikrobiom – metody analýzy
 - **transkriptomika** → vymezení exprese mikrobiálních a hostitelských genů v kontextu orálního zdraví a patologie
 - sekvenování mRNA (metatranskriptomika)
 - pomocí náhodných hexamerových primerů
 - přehled o životaschopných a transkripčně aktivních mikrobech
 - paralelní hodnocení mikrobiálních a hostitelských transkriptomů → zkoumány za účelem posouzení [interaktomu](#)
 - **metabolomika** → metabolické a funkční aktivity hostitele a jeho mikrobiomu → pohled na složité mezidruhové interakce
 - nízkomolekulární metabolity, proteiny
 - kapalinová/plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, NMR

 - parodontitida → charakteristický posun ve složení orálních bakterií, který je zčásti zprostředkován bakteriálními metabolity → metabolomika → jak a proč k tomuto posunu dochází
 - [může nabídnout vodítko pro kritické časové body, ve kterých by mohly být přínosné terapeutické zásahy](#)

Molekulární analýza OM

- Orální mikrobiom – metody analýzy
 - **proteomika** → profil všech proteinů v organismu, tkáni, buňce nebo biologické tekutině nebo podsložce kterékoli z nich → pohled při zdraví/nemoci
 - proteiny ze vzorku → ne/Jsou, množství, posttranslační modifikace, izoformy, molekulární interakce
 - 1-D/2-D gelová elektroforéza s hmot. spektrometrií, kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
 - k charakterizaci změn při gingivitidě, mírné, středně těžké a chronické parodontitidě
 - **vysoce rozlišovací techniky + klinické údaje + longitudinální studie → pochopení interakcí mikrobioty od druhové úrovně po molekulární úroveň a jejich důsledků na zdraví hostitele**

Molekulární analýza OM



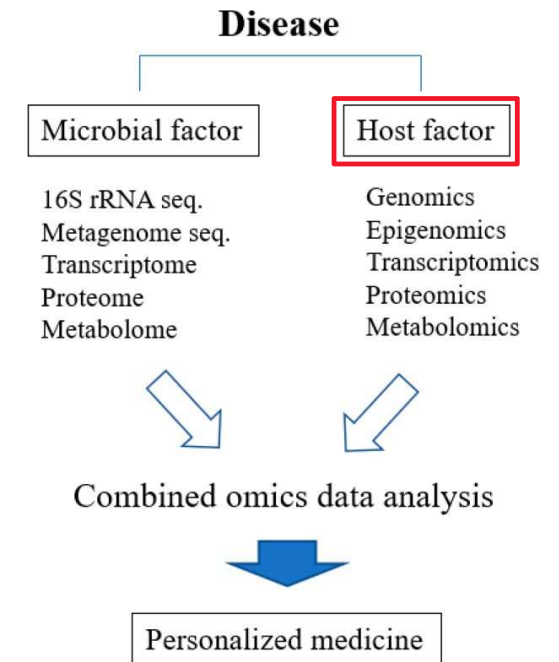
Schematics of standard techniques used in microbiome studies. **(A)** Marker gene sequencing techniques can use primers to target certain conserved regions of a genome to capture intermittent variable regions, which can then be used to identify organisms in a sample rapidly and inexpensively. The 16S rRNA gene is the most commonly used marker gene in bacteria and archaea, and in the figure, primers are used to capture the V3 and V4 variable regions together, a common approach for 16S sequencing. The internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear rRNA cistron in fungi is made of two segments, which can be captured with primers targeting the 18S, 5.8S, and 28S rRNA sections that surround them. **(B–D)** Instead of targeting one small segment of the genome, these techniques capture the entirety of the genetic material from an organism. **(B)** Single virus genomics (SVG) uses a fluorescent stain to isolate individual virus particles in a sample by fluorescence-activated virus sorting (FAVS), wherein they are embedded in an agarose bead before undergoing whole genome amplification and sequencing. **(C)** Whole metagenome shotgun sequencing (WMS) involves the fragmentation of all DNA in a sample, sequencing of the fragments, and assembly of the sequences, which can then be mapped to reference genomes, or de novo assembly can be performed. **(D)** Metatranscriptomics also involves a shotgun sequencing approach, but it is performed after mRNA extraction. The outputs then allow for differential gene expression analysis. **(E)** Metabolomics and metaproteomics allow for quantification of the metabolites and proteins produced by the microbiome in a sample, respectively. Mass spectrometry is a common approach to quantification.

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

→ klinická uplatnění

- predikce náchylnosti k onemocněním DÚ
- mikrobiální screening na systémová onemocnění
- včasná diagnóza onemocnění (ještě před výskytem symptomů)
- sledování průběhu onemocnění a účinnosti léčby (posun mikrobioty z dysbiózy), cílená léčba
- účinný nástroj pro prevenci (viditelný důkaz přístupu pacienta k péči o chrup)
- vývoj nových terapeutických přístupů, personalizovaná dentální léčba
- výzkum – snaha o úplnou charakterizaci „zdravého“ mikrobiomu (Které komponenty mikrobiomu je nejvhodnější sledovat, aby bylo možné vyhodnotit návrat mikrobiomu ze stavu dysbiózy do stavu kompatibilního se zdravím? Stačí sledovat pouze vybrané klíčové druhy nebo je nutné používat vícedruhové eseje?)



Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– testovací v ordinaci (chair-side/point-of-care testování):

náchylnost k zubnímu kazu – přístroj **CariScreen Susceptibility Testing Meter** (Oral BioTech LLC)

→ bakteriální aktivita *S. mutans*

→ po setření plaku ze zubní plošky dojde ve speciální štětičce k bioluminiscenční reakci ATP, která je změřena přístrojem

parodontitida – BANA-Enzymatic test™ kit, Evalusite kit (imunoesej)

– laboratorní analýza

komerční testy - příklad

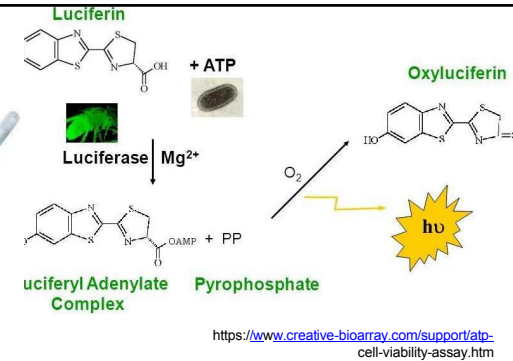
parodontitida – kit MyPerioPath® (OralDNA Lab)

→ testuje ze sliny přítomnost a množství 11 bakterií, které přispívají ke vzniku parodontitidy (analýza metodou kvantitativní PCR v reálném čase)

ELISA test → antigeny *P. gingivalis*



<https://carifree.com/product/pro-cariscreen-testing-meter/>



MYPERIOPATH®	
High Risk Pathogens	
Aa	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Pg	Porphyromonas gingivalis
Tf	Tannerella forsythia
Td	Treponema denticola
Moderate Risk Pathogens	
En	Eubacterium nodatum
Fn	Fusobacterium nucleatum/periodontium
Pi	Prevotella intermedia
Cr	Campylobacter rectus
Pm	Peptostreptococcus (Micromonas) micros
Low Risk Pathogens	
Ec	Eikenella corrodens
Cs	Capnocytophaga species (gingivalis, ochracea, sputigena)

Molekulární analýza OM

Table 2. Examples of biomarker assay kits in the market.

Microbiological assay	Subgingival plaque	Evalusite	<i>Aa, Pg, Pi</i>	Sandwich enzyme immunoassay (Colorimetric assays)	Chairside
	Subgingival plaque	BANA-Enzymatic test kit	<i>Pg, Td, Tf</i>	BANA hydrolysis reaction (Colorimetric assays)	
	Gums and plaque	OMNIgene ORAL/OMR-110	Characterization of virus species of all genome type including <i>Aa, Pg, Pt, Fn, Td, Ec</i>	DNA hybridization	Company or research laboratory
	Saliva	OMNIgene ORAL/OM-501, 505			
	Subgingival plaque	Carpegen [®] Perio Diagnostik	<i>Aa, Pg, Tf, Td, Fn, Pi</i>	Real-time qPCR	
	Oral rinse	MyPerioPath [®]	<i>Aa, Pg, Td, Tf, En, Fn, Pi, Cr, Pm, Ec, Cs</i>	DNA hybridization	
	Microbiological samples/subgingival plaque	iai Pado Test	<i>Aa, Pg, Pi, Td, Tf, Fa</i>	DNA hybridization	
Subgingival plaque	micro-IDent [®] plus11	<i>Aa, Pg, Pi, Tf, Td, Pm, Fn, Cr, En, Ec, Cs</i>	DNA hybridization		
Genetic assay	Cheek swab	PerioPredict [™]	genes for IL-1	DNA hybridization	
	Oral rinse	MyPerioID [®] IL-6 or IL-1	genes for IL-6 or IL-1	Genetic polymorphisms detection	

GCF: Gingival crevicular fluid, AST: Aspartate aminotransferase, aMMP: active Matrix metalloproteinase, *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*, *Pi*: *Prevotella intermedia*, *Td*: *Treponema denticola*, *Tf*: *Tannerella forsythia*, *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*, *Ec*: *Eikenella corrodens*, *En*: *Eubacterium nodatum*, *Fn*: *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Cr*: *Campylobacter rectus*, *Pm*: *Peptostreptococcus (Micromonas) micros*, *Cs*: *Capnocytophaga species (gingivalis, ochracea, sputigena)*, *Fa*: *Filifactor alocis*, *IL*: Interleukin, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

– databáze

The screenshot displays the eHOMD (expanded Human Oral Microbiome Database V3.1) website. At the top, there is a navigation bar with links for HOME, Taxonomy, Genomes, Proteomes, 16S rRNA Microbiome, Animal Microbiomes, Downloads, Resources, and HOMP-v2. A search bar is located on the right. Below the navigation bar, a message states: "eHOMD has been updated to version 3.1 (Update Detail)".

The main content area features a descriptive paragraph: "eHOMD provides comprehensive curated information on bacteria in the human mouth and aerodigestive tract, including the pharynx, nasal passages, sinuses and esophagus. There are 774 oral bacterial species. 58% are officially named, 16% unnamed but cultivated and 26% are known only as uncultivated phylotypes. eHOMD taxonomy provides a provisional naming scheme for the currently unnamed taxa, based on the 16S rRNA sequence phylogeny, so that strain, clone and probe data from any laboratory can be directly linked to a stably named reference scheme."

Below the text, a prompt reads: "Click on the menu items above or the tabs below for more resources:". This is followed by a grid of interactive panels:

- Taxonomy**: Includes Taxon Table, Taxon Description, Ecology, and Dynamic Taxon Hierarchy.
- Genomic**: Includes Genome Table, JBrowse Genome Viewer, Genomic Trees, and Genomic BLAST.
- 16S rRNA RefSeq**: Includes BLAST and Download 16S rRNA RefSeq.

Health

How the microbiome changes our idea of what it means to be human

The microbes living on and in you can change your mood, your mind and your health - challenging our ideas about human nature

By Rowan Hooper

3 October 2023



A new understanding of the microbiome suggest humans should think of themselves as metaorganisms
Sami Fakoner

YOU may, quite reasonably, think you are an individual of the species *Homo sapiens*. Once you have finished reading what follows, you will hopefully have been convinced that there is far more to us than that. Trillions of other organisms live on (and, more notably, in) your body. As you will see in the reports that follow, their impact on you is such that you will probably never think about yourself in the same way again. Your microbes change who you

Until recently, scientists believed that there were three discrete parts of our nature that reflected solid aspects of an individual self: the **immune system, the genome and the brain**. "None of these pillars of the traditional definitions of the self – immunity, genome integrity, the central nervous system – are free of microbial impact,"

Regardless of birth route, the researchers found that approximately **58.5%** of a baby's microbiome is derived from its mother. However, different maternal microbial communities contributed to different infant microbiomes. Cesarean-born babies received fewer microbes from their mother's vaginal and fecal microbiomes, but—seemingly in compensation—acquired **more microbes from breastmilk**.

maternal microbiome explains almost **60%** of the infant's total microbiome, but there's still 40% that we don't know about,

NEWS RELEASE 8-MAR-2023

Whether born naturally or via cesarean section, babies receive essential microbes from their mothers

Peer-Reviewed Publication

CELL PRESS

Do cesarean-born babies miss out on essential microbes? New evidence suggests that the answer may be "no." Researchers report March 8 in the journal *Cell Host & Microbe* that mothers are able to transfer microbes to their babies via alternative, compensatory routes. While cesarean-born babies do receive less of their mother's gut microbiome during birth, they make up for this by drinking their mother's microbes in breastmilk.

Most microbiome research has focused on the gut, but we also house beneficial microbial communities in other parts of our bodies, such as in our respiratory tracts and on our skin. This study helps clarify how babies, who are generally considered sterile before birth, get essential microbes for their various microbiomes.



IMAGE: THIS IS AN ILLUSTRATION OF A MOTHER AND INFANT AND THE MICROBES THAT ARE TRANSMITTED FROM MOTHER TO INFANT. [view more >](#)

CREDIT: MARI-LEE ODENDAAL



- **vertical transmission:** microbes passing from one generation to the next
- **horizontal transmission:** microbes passing between people in close contact, including friends and family

- 7646 stool and 2,069 saliva samples from 20 countries on five continents
- mother-infant pairs, members of shared households, twins, residents of villages, and large populations.

MOTHER-CHILD RELATIONSHIPS

- **mothers living with their kids aged 3 years** or younger shared **34%** of their gut bacteria strains. This is **higher than** the percentage of strains **shared between identical twins**.
- **By the age of 18**, the percentage of shared strains drops to 19%. By the time we hit 30, it's 15%.
- mothers' influence identified on participants' microbiomes in people aged 50–85.

A SHARED LIFE

- family members, friends, housemates, pets, and partners -people's gut microbiomes more **closely matched those of the people they lived** with than those of other people in the same region.
- people living in the same village — but not the same home — had more shared microbes than people living in the same part of the world but in different villages

MOUTH TO MOUTH

- transmission of oral microbiom from mother to child was much less important. Rather, everyone you live with plays a part.
- **oral microbiom becomes more similar to your mother's as you get older**. The researchers found that you share an average of **49 species in your first year, but an average of 85 species at age 18**.
- **couples tended to share more species than parents or siblings**. This, they hypothesize, might be due to, ahem, "intimacy."

nature

Explore content ▾ About the journal ▾ Publish with us ▾

[nature](#) > [articles](#) > article

Article | [Open access](#) | [Published: 18 January 2023](#)

The person-to-person transmission landscape of the gut and oral microbiomes

[Mireia Valles-Colomer](#) , [Aitor Blanco-Míguez](#), [Paolo Manghi](#), [Francesco Asnicar](#), [Leonard Dubois](#), [Davide Golzato](#), [Federica Armanini](#), [Fabio Cumbo](#), [Kun D. Huang](#), [Serena Manara](#), [Giulia Masetti](#), [Federica Pinto](#), [Elisa Piperni](#), [Michal Punčochář](#), [Liviana Ricci](#), [Moreno Zolfo](#), [Olivia Farrant](#), [Adriana Goncalves](#), [Marta Selma-Royo](#), [Ana G. Binetti](#), [Jimmy E. Becerra](#), [Bei Han](#), [John Lusingu](#), [John Amuasi](#), ... [Nicola Segata](#)  [+ Show authors](#)

Nature **614**, 125–135 (2023) | [Cite this article](#)

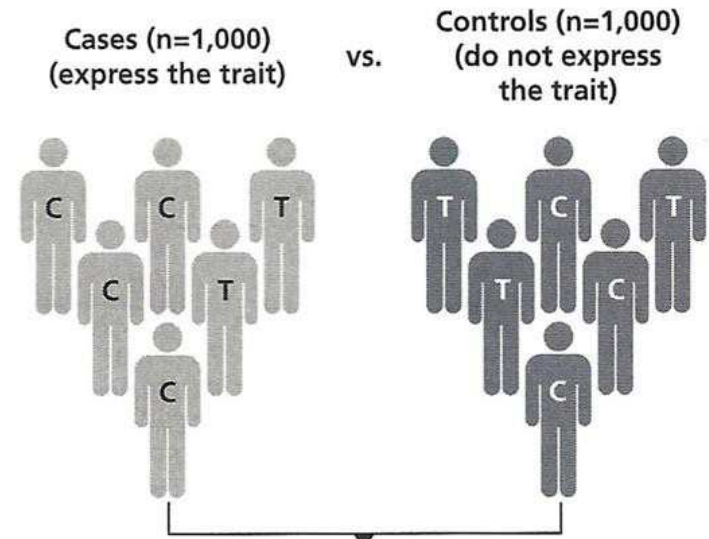
99k Accesses | 82 Citations | 1242 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

The human microbiome is an integral component of the human body and a co-determinant of several health conditions^{1,2}. However, the extent to which interpersonal relations shape the individual genetic makeup of the microbiome and its transmission within and across populations remains largely unknown^{3,4}. Here, capitalizing on more than 9,700 human metagenomes and computational strain-level profiling, we detected extensive bacterial strain sharing across individuals (more than 10 million instances) with distinct mother-to-infant, intra-household and intra-population transmission patterns. Mother-to-infant gut

Genetické asociační studie kandidátních genů (case-control studies)

Case-control study for genetic association



	C	T
Cases	62%	38%
Controls	49%	51%

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny

– Výběr vhodných kandidátních genů

- na základě známé biologické, fyziologické anebo funkční významnosti ve vztahu k danému onemocnění
- hledání nových potenciálních genů (alel) v celém genomu (GWAS, QTL – lokusy kvantitativních znaků)

– Výběr vhodných kandidátních genů pro studie zubního kazu

- geny, které se účastní vývoje zubu a ovlivňují tak jeho morfologii
- geny, které souvisí s imunitní odpovědí
- geny, které souvisí s produkcí a složením sliny
- geny, které souvisí s chuťovými preferencemi

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny

– Výběr alel (polymorfismů)

→ SNP (Single Nucleotide Polymorphism), CNV (Copy Number Variation), VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)

→ na základě studií, které již byly provedeny v rámci jiných populací

→ alela má v dané populaci dostatečnou frekvenci
(větší soubor případů/kontrol → můžeme si dovolit studovat alely i s nižší frekvencí v populaci)

→ vazebná nerovnováha mezi SNPs → tagSNP

Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

– výběr vhodného metodického přístupu

→ počet polymorfismů, které budou stanovovány

→ celkový počet vzorků, které budou genotypizovány

→ kvalita analyzované DNA (genomová DNA – krev, slina, bukalní stěr)

→ náklady na přístroje, chemii a spotřební materiál

→ dostupnost komerčních služeb pro genotypizaci

Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

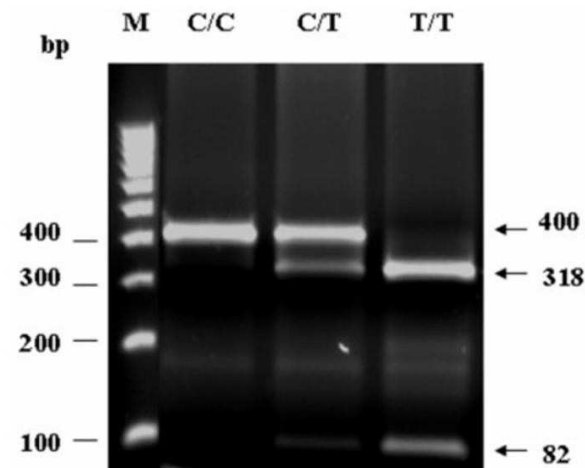
- **PCR+RFLP** (restriction fragment length polymorphism)
= *polymorfizmus délky restričních fragmentů*
→ PCR s následným specifickým restričním štěpením

SNP součástí
palindromní sekvence



I. alela → 5' ... G A G T C ... 3'

II. alela → 5' ... G A G C C ... 3'



Huang, BCM Cancer (2008)

Genetické asociační studie

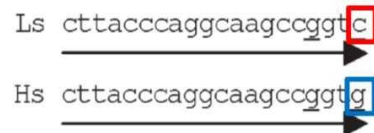
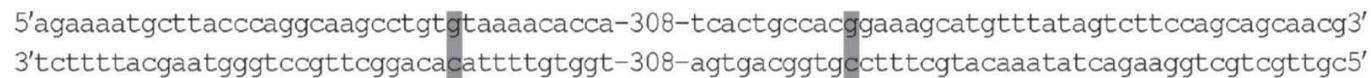
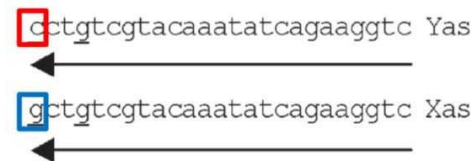
– Metody genotypizace

- **alelově specifická PCR**

→ primer specifický pro SNP → jestliže je přítomný daný SNP dojde k amplifikaci → vznik detekovatelného produktu



<https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.10.007>

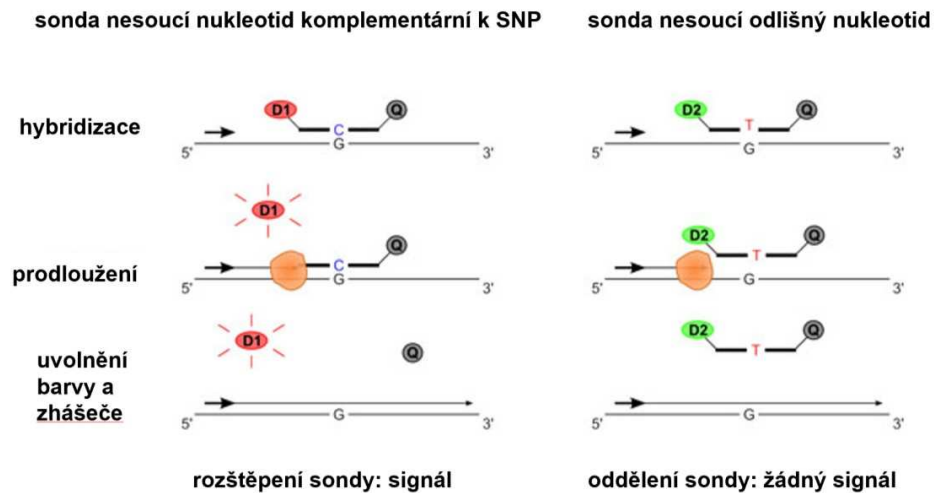
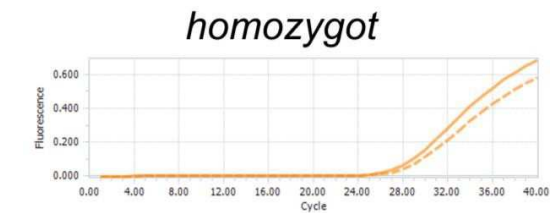
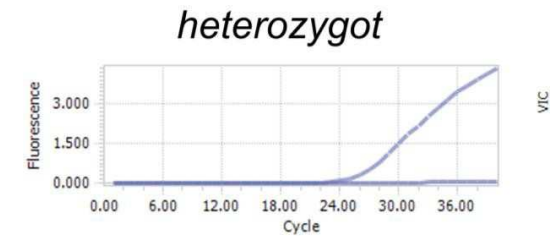


Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

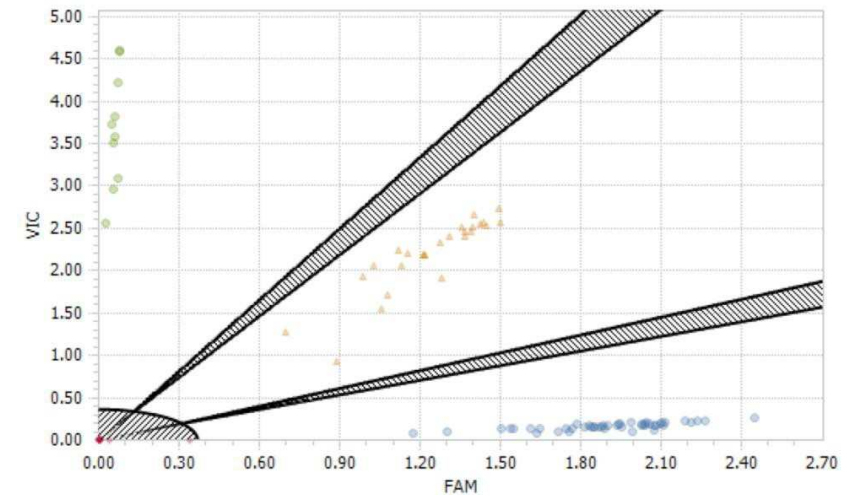
- **real-time PCR**

→ komerční sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific) → fluorescenčně značené hybridizační sondy



D1 barva 1 D2 barva 2 Q zhášedce O DNA polymerasa → Forward primer

<http://www.applied-maths.com/applications/taqman-based-snp-genotyping>

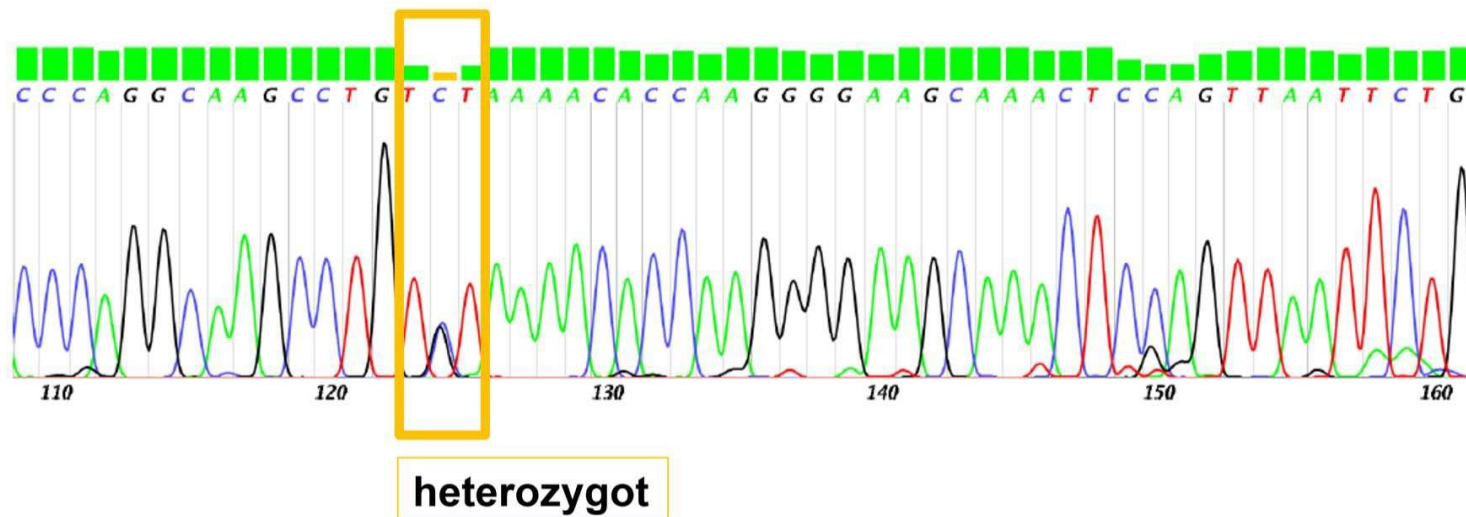


Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

- **sekvenační analýza**

→ kompletní sekvence vybraného úseku



Genetické asociační studie

- Metody genotypizace
 - Single Nucleotide Polymorphism Detection with the iPLEX® Assay and the MassARRAY® System



Genetické asociační studie

Comparison of methods used for mannose-binding lectin gene (*MBL2*) genotyping.

	Allele-Specific PCR (AS-PCR)	ARMS ³ /Double ARMS ³ (+ Multiplex Allele-Specific PCR)	PCR and Restriction-Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)	Commercial TaqMan Assay ⁵	High-Resolution Melt Analysis (HRMA)	Commercial INNO-LiPA MBL2 kit (Reverse PCR-SSOP)	Pyro-Sequencing	Sanger Sequencing	MBL2 SNaPshot Assay
principle of allele discrimination/detection	PCR with a primer specific for one allele	PCR with primers specific for both alleles	allele-specific enzymatic cleavage of PCR amplicon	allele-specific hybridization of fluorescently labelled probe	temperature-dependent allele-specific hybridization of fluorescently labelled probe	hybridization of biotinylated PCR product with membrane immobilized sequence-specific oligonucleotide probes	chemiluminescence-based detection of nucleotides during sequencing-by-synthesis reaction	detection of the sequence of an oligonucleotide amplified in PCR with fluorescently labelled dideoxynucleotides	allele-specific SBE by a single fluorescently labelled dideoxynucleotide (minisequencing)
post-PCR analysis	yes	yes	yes	no	no, when real-time PCR thermocycler is used	yes	no	yes	yes
analysis time	2 h ²	2–3 h ²	2 h + 1–3 h ⁴	1–2 h ⁶	1–1.5 h + 2–8 min. ⁸	3–4 h	2–3 h	6–7 h	5–6 h
number of work steps	2 (PCR, gel analysis)	2 (PCR, gel analysis)	4 (PCR, gel analysis, RFLP, gel analysis)	1 (real-time PCR)	1 (when real-time PCR thermocycler is used for PCR and subsequent melting temperature analysis)	9 (PCR, gel analysis, denaturation, hybridization, 2 washing steps, 3-step color development)	4 (PCR, gel analysis, purification, pyrosequencing)	5 (PCR, enzymatic cleaning, sequencing reaction, purification, analysis on sequencer)	5 (PCR, enzymatic cleaning, SBE reaction, enzymatic cleaning, analysis on sequencer)
automatic analysis	no	no	no	yes	yes	no	yes	yes	yes
number of analyses for complete <i>MBL2</i> haplogenotype¹	12	6	6	6	5	1	4 ⁹	2	1
number of oligonucleotide primers + labelled primers/probes for complete <i>MBL2</i> haplogenotype¹	24 primers	15 primers	6 primers	6 TaqMan assays (12 primers + 12 TaqMan probes)	10 primers + 5 TaqMan probes	4 primers	8 primers + 4 biotinylated primers	2 primers	8 primers
estimated cost of analysis of whole haplogenotype¹	1 USD	1 USD	2 USD	2 USD	1 USD	product was discontinued	2 USD	5 USD	1.50 USD
input amount of template DNA	20–200 ng	20–200 ng	50–500 ng	1–20 ng	10–20 ng	200–500 ng	10–100 ng	10–250 ng	10–100 ng
assay robustness	low	low	low–medium	medium–high	high	low–medium	medium	medium–high	medium–high
special equipment requirement	-	-	-	real-time PCR thermocycler	real-time PCR thermocycler or fluorescence scanning/detection system	water bath with shaking platform, aspiration apparatus	vacuum prep workstation, pyrosequencing machine	automated DNA sequencer	automated DNA sequencer
SNP genotyping throughput	low	low	low	high	high	medium	high	high	high
software for automatic allele calling	no	no	no	yes (SDS software, SNPman program) ⁷	yes (real-time PCR instruments with HRMA compatible software with genotype auto-calling function)	no	no	yes (Mutation Surveyor, GeneMarker, Minor Variant Finder Software, SeqScape™ Software, Variant Reporter™ Software) ¹⁰	yes (GeneMapper, GeneMarker) ¹¹
Ref.	[41]	[30,42]	[43,44]	[27]	[28]	[29]	[45]	[37]	-

rs11003125, rs7096206, rs7095891, rs5030737, rs1800450 and rs1800451;² Analysis time depends on polymerase chain reaction (PCR) length and gel concentration; ³ ARMS—amplification refractory mutation system; ⁴ Separation time depends on gel concentration and the length of cleaved fragments; ⁵ TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems), probes: C_11876879_10 (rs11003125), C_27858274_10 (rs7096206), C_26813436_10 (rs7095891), C_2336610_10 (rs5030737), C_2336609_20 (rs1800450) and C_2336608_20 (rs1800451); ⁶ depends on number of cycles; ⁷ Sequence Detection Software (SDS) by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)), SNPman program by Konopac et al. [46]; ⁸ Time of temperature melt analysis depends on a temperature range and thermal ramp rate of the instrument. Due to the proximity of the three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 1 only one analysis is needed to determine these SNPs; ⁹ Mutation Surveyor[®] and GeneMarker[®] by SoftGenetics[®] (<https://softgenetics.com> (accessed on 2 November 2020)), Minor Variant Finder Software, SeqScape™ Software and Variant Reporter™ Software by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)); ¹⁰ GeneMapper™ by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)), GeneMarker[®] by SoftGenetics[®] (<https://softgenetics.com> (accessed on 2 November 2020)). Single-base extension (SBE). Mannose-binding lectin gene (*MBL2*). Reverse hybridization with membrane-immobilized sequence-specific oligonucleotide probes (reverse PCR-SSOP).

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

– Proteiny zapojené do vývoje skloviny

AMELX – gen pro amelogenin

ENAM – gen pro enamelin

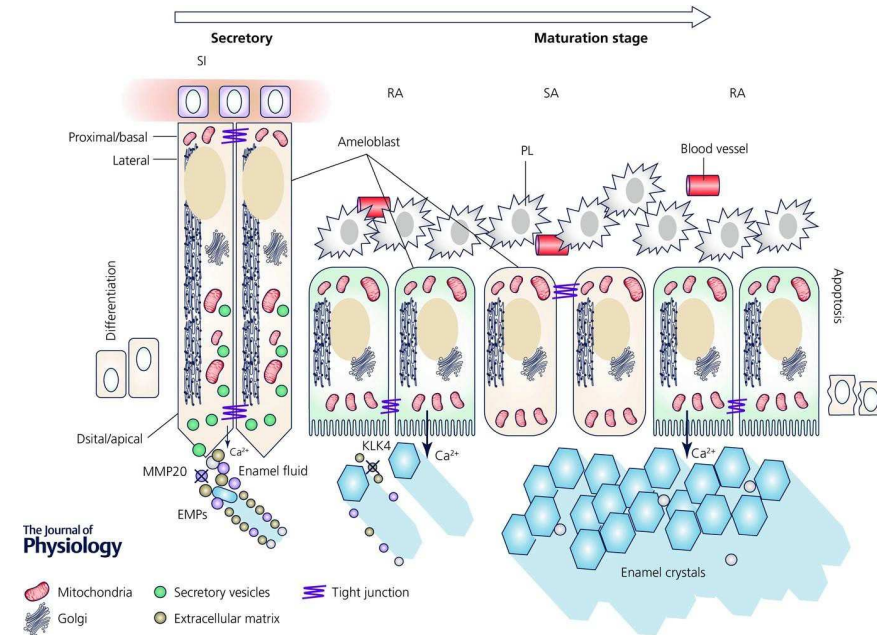
TUFT1 – gen pro tuftelin

KLK4 – gen pro kallikrein 4

AMBN – gen pro ameloblastin

TFIP11 – gen pro protein interagující s tuftelinem

MMPs (MMP20) – geny pro matrixové metaloproteinázy



Schematic diagram of histological changes in amelogenesis. The histological development of enamel crystals goes hand in hand with changes in ameloblast morphology. Undifferentiated epithelial cells receive signals to transform into secretory ameloblast cells of some 75 μm tall and $\sim 5 \mu\text{m}$ in diameter with a specialized distal cell process (Tomes' process) which plays an important role in matrix exocytosis. These same cells will retransform into shorter cells ($\sim 35 \mu\text{m}$ tall) during maturation devoid of the Tomes' process. In maturation stage, ameloblasts undergo cyclical changes from a cell with a distal ruffled border, the ruffled-ameloblast (RA), to a cell with a smooth distal border, the smooth-ameloblast (SA). Tight junctions are found at the basal and apical pole of secretory ameloblasts. The apical or distal pole is closest to the enamel crystals. In RA cells, tight junctions are found only at the apical pole but in SA cells they are located at the basal pole. Organellar distribution differs in cells at each stage (see text for details). SI = stratum intermedium, PL = papillary layer, EMPs = enamel matrix proteins. MMP20 and KLK4 are the main proteases in AMEL processing. See also organellar distribution at each stage.

<https://doi.org/10.1113/JP272775>

<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.071>

MUNI
MED

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

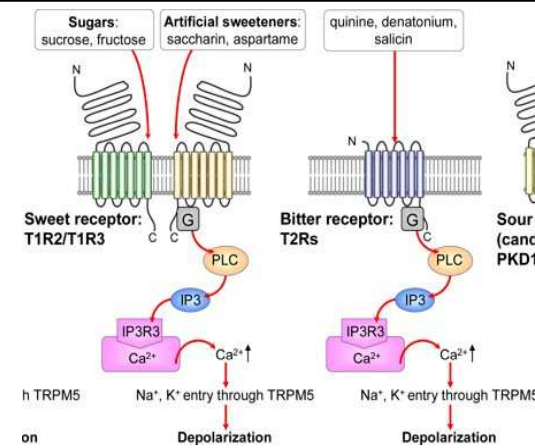
– Chuťové receptory → asociace s preferencí ke sladké chuti → ↑ příjem cukrů

TAS2R38 – gen pro chuťový receptor (Taste receptor 2 member 38) – receptor spřažený s G-proteinem, zodpovědný za citlivost k hořké chuti

TAS1R1/TAS1R3 – geny pro chuťové receptory (Taste receptor 1 member 1/3) – receptory spřažené s G-proteinem, zodpovědné za citlivost ke sladké chuti

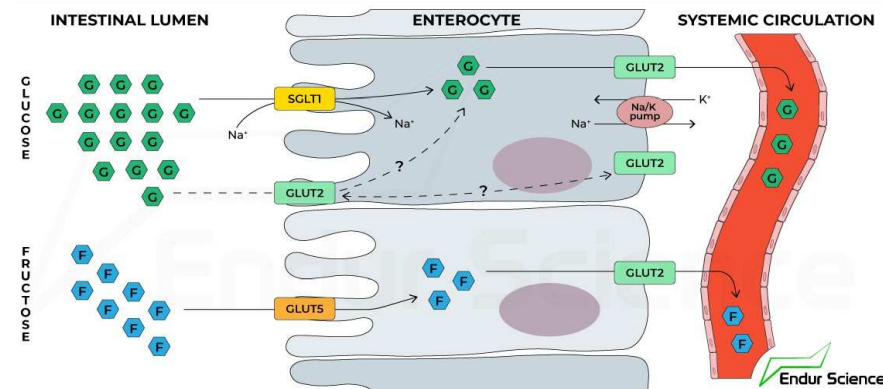
– Glukózový transportér → asociace s preferencí ke sladké chuti → ↑ příjem cukrů

GLUT2 – gen pro glukózový transportér 2 – potřebný pro glukózou stimulovanou sekreci inzulínu (β -buňky pankreatu), řídí vnímání glukózy (nervový systém) → kontrola příjmu potravy, jeho exprese nutná pro fyziologickou kontrolu genů citlivých na glukózu a její inaktivace vede ke zhoršené glukózou stimulované sekreci inzulínu (játra)



<https://doi.org/10.3390/s100403411>

Absorption of carbohydrates



<https://doi.org/10.1080/00016357.2020.1832253>

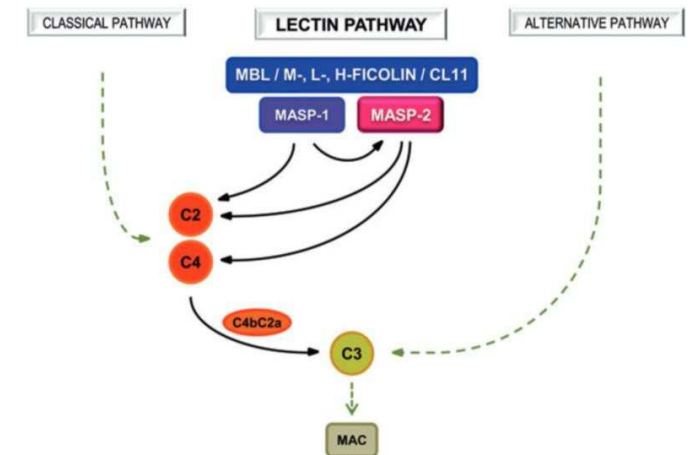
Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

- Proteiny imunitní odpovědi

MBL2 – gen pro lektin vázající manózu (mannose-binding lectin) – rozpustný sérový lektin rozpoznávající specifické sacharidy na površích bakterií → ↓ aktivace komplementu

https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2_7-1



Schematic representation of the lectin pathway of the complement system. The lectin pathway (LP) is triggered by five pattern recognition receptors (PRR): mannose-binding lectin (MBL), ficolin-1, -2, and -3, and collectin 11 (CL11 or CL-K1). The LP is initiated when these PRRs bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on the surface of pathogens or to apoptotic or necrotic cells (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Circulating MBL, CL11, and ficolins form complexes with MASP-1 and MASP-2. After the binding of MBL, ficolins, and CL-11 to their targets, MASP-1 auto-activates and triggers MASP-2. Activated MASP-2 cleaves C4 and C2 allowing the assembly of the C3 (C4bC2a) and C5 (C4bC2a(C3)_n) convertases and the subsequent activation of the terminal pathway. Activated MASP-1 also cleaves C2. MAC = membrane attack complex.

<https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1856821>

Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

- Proteiny sliny

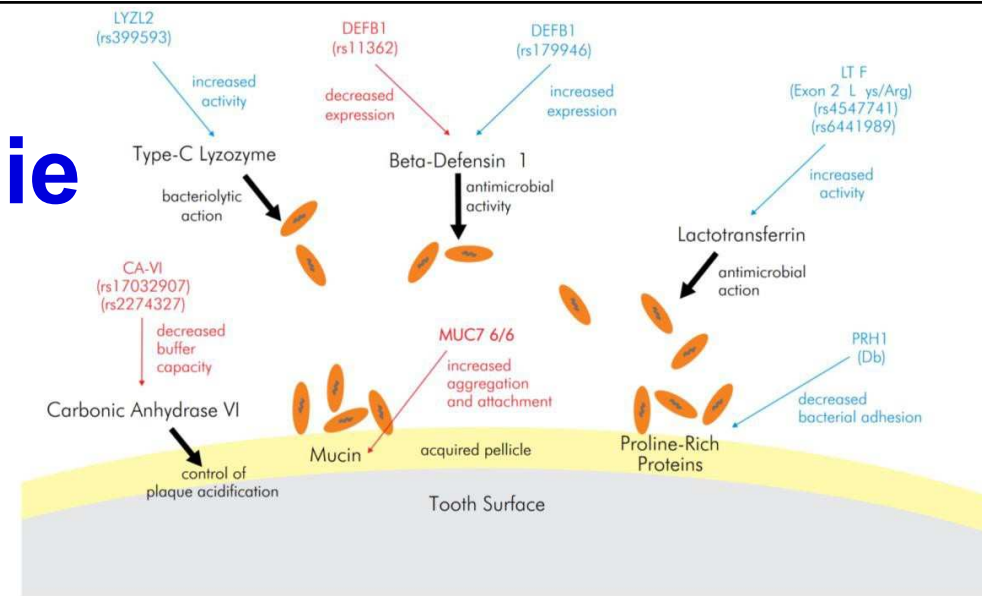


Figure 4. Salivary proteins and functions (black) that present polymorphisms associated positively (red) or negatively (blue) with dental caries experience.

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0041>

DEFB1 – gen pro beta defenzin 1 – antimikrobiální peptid z rodiny defenzinů (alfa, beta), která zahrnuje cyklické kationtové peptidy bohaté na cystein. Jsou součástí vrozené imunity, vytváří kanály v cytoplasmatické membráně bakterií, stimulují imunitní systém vč. komplementu (klasická cesta), působí jako chemoatraktanty.

LTF – gen pro laktoferin – transportní globulární glykoprotein, váže volné železo. Součást vrozené imunity, antibakteriální (při interakci s bakteriální membránami vznikají peroxidy), antivirová (kompetice adheze virových částic na buňky hostitele, vazba na částice určitých typů virů), antifungální (proti *C. albicans*) aktivita, stimulace fagocytózy.

LYZL2 – gen pro lysozomu podobný protein 2 (lysozyme-like protein 2) – součástí rodiny lysozymů typu C. Hydrolyzuje glykosidické vazby v peptidoglykanech (rozkládá buněčnou stěnu G⁺ bakterií).

Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

- Proteiny sliny

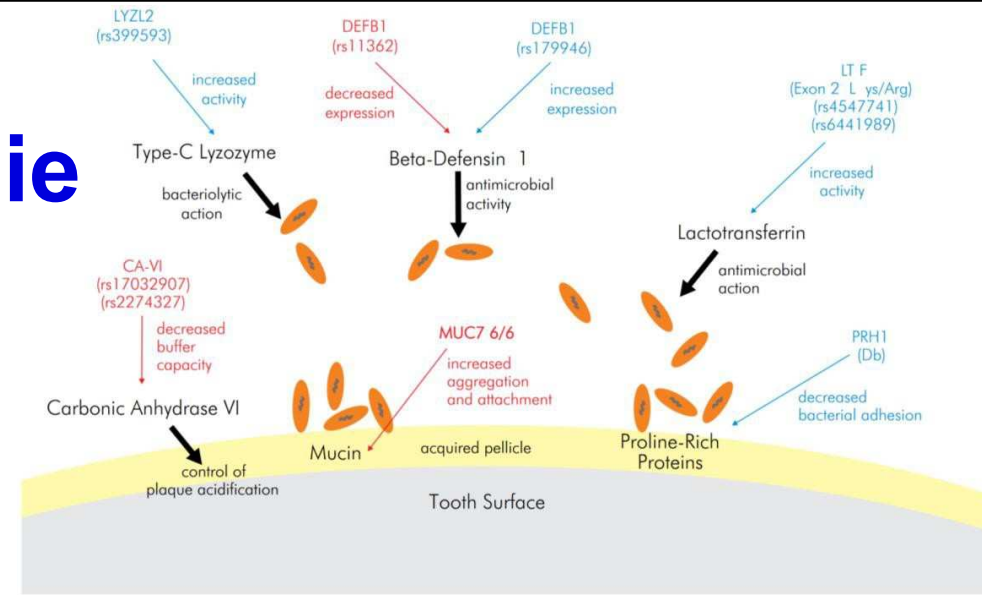


Figure 4. Salivary proteins and functions (black) that present polymorphisms associated positively (red) or negatively (blue) with dental caries experience.

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0041>

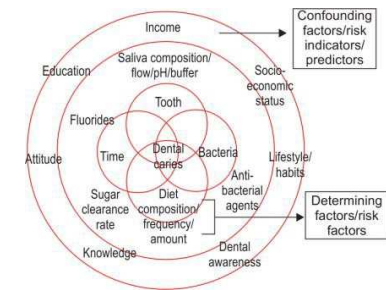
CA6 – gen pro karbonickou anhydrázu VI – enzym gustin, katalyzuje hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanového iontu a protonu, kontrola pH sliny (bikarbonátový pufrací systém).

MUC7 – gen pro mucin 7 – nízkomolekulární glykoprotein (MG2), podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

MUC5B – gen pro mucin 5B – glykoprotein, podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

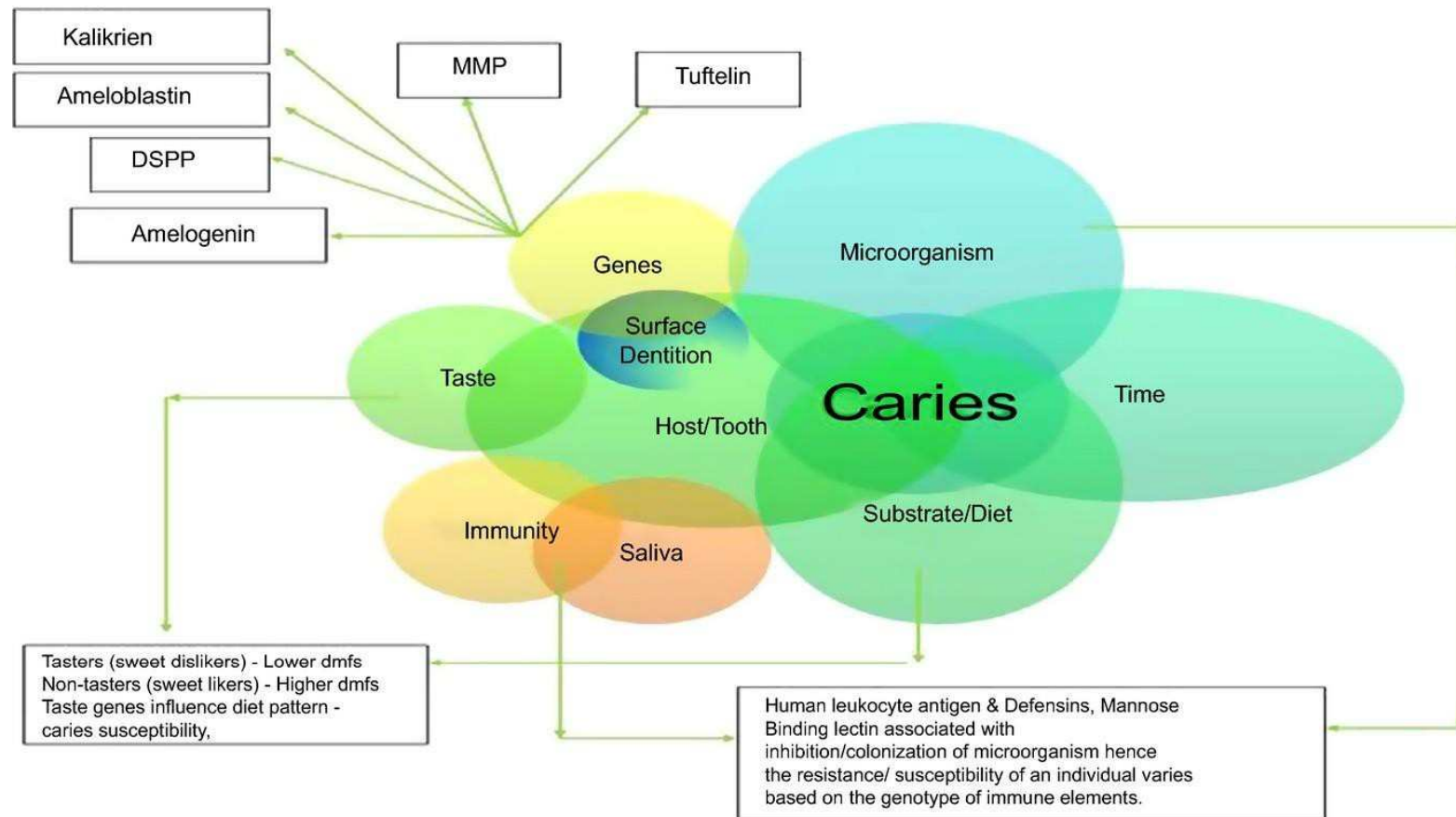
PRH1 – gen pro kyselý PRP – protein bohatý na prolin (proline-rich protein), podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

Genetické asociační studie



– Úskalí genetických asociačních studií ve vztahu k zubnímu kazu

- příliš mnoho faktorů majících úlohu v etiopatogenezi → pacienti (cases) nikdy nejde dokonale roztrdit do kategorií → nelze vytvořit dokonale definovaný soubor → maximálně definovaný soubor dle možností
- většina studií nepotvrdí asociaci pouze naznačí, ale málokdy potvrdí (některé studie dávají dokonce protichůdné výsledky) → další studie, nezbytné k porozumění předchozích nalezených korelací
- Další asociační studie s více vzorky → studie jednotlivých polymorfismů (ale jejich efekt může být malý), ale i genů a lokusů (gene-based a gene-cluster analýzy → další posílení výsledků
- meta-analýza – kombinace dat získaných vyčerpávajícím vyhledáváním publikovaných i nepublikovaných světových dat → zvyšování konzistence výsledků (tím, že se zvyšuje síla výsledku). Mnoho primárních studií je příliš malých nato, aby mohly prokázat důležitý klinický účinek (nemají dostatečnou sílu). Kombinací všech studií, které odpovídají na stejnou klinickou otázku → zvýšení statistické, klinické nebo významové síly
- podrobné dotazníky pro zhodnocení vlivu psychologických, sociologických, ekonomických a behaviorálních faktorů → rozmělnění souboru na příliš velké množství skupinek o příliš malém počtu pacientů



<https://doi.org/10.1111/adj.12262>