

Ana Nemec

VPLIV PERORALNE OKUŽBE Z BAKTERIJO *Porphyromonas gingivalis* NA
SISTEMSKO RAVEN DUŠIKOVEGA OKSIDA PRI MIŠIH

Delo je bilo opravljeno na

Kliniki za kirurgijo in male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnik
prof. dr. Jože Kogovšek, dr. vet. med.,

Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan, vodja prof. dr. Igor Muševič, dipl. ing.
fiz.,

Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v
Ljubljani, predstojnica prof. dr. Azra Pogačnik, dr. vet. med.,

Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra Ljubljana, predstojnik
doc. dr. Milan Skitek, mag. farm.,

Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnik doc. dr. Branko Krt, dr. vet. med. in na

Centru za genomiko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnik prof. dr. Gregor
Majdič, dr. vet. med.

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: prof. dr. Zlatko Pavlica, dr. vet. med.

Somentor: prof. dr. Milan Petelin, dr. stom.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Uroš Skalarič, dr. stom.

članica: doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med.

članica: znan. svet. dr. Marjeta Šentjurc, dipl. ing. fiz.

član: prof. dr. Gregor Fazarinc, dr. vet. med.

VSEBINA

OKRAJŠAVE	8
IZVLEČEK	10
ABSTRACT	12
1 UVOD	14
1.1 Namen raziskave.....	15
2 PREGLED LITERATURE	17
2.1 Vloga dušikovega oksida v bioloških sistemih	17
2.1.1 Lastnosti in kemična reaktivnost dušikovega oksida	17
2.1.2 Nastajanje dušikovega oksida v organizmu.....	18
2.1.3 Biološki učinki dušikovega oksida	20
2.2 Dokazovanje prisotnosti dušikovega oksida	22
2.2.1 Neposredno dokazovanje dušikovega oksida z metodo elektronske paramagnetne resonance	22
2.2.1.1 Železo-nitrozil ditiolni kompleksi - FeNO(DETC) ₂	23
2.2.2 Posredno dokazovanje dušikovega oksida z meritvijo nitrita in nitrata v plazmi z reakcijo po Griessu	25
2.2.3 Posredno dokazovanje dušikovega oksida z uporabo inhibitorjev sintaz dušikovega oksida.....	26
2.3 Mehanizmi patogenosti bakterije <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
2.3.1 Sistemski učinki lokalne okužbe	29
2.3.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i> in nastajanje dušikovega oksida.....	30
3 MATERIALI IN METODE	32
3.1 Živali.....	32
3.2 Zasnova študije	32
3.2.1 Akutna okužba s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	32
3.2.2 Kronična okužba s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	33
3.3 Kultura <i>Porphyromonas gingivalis</i>	36
3.4 Inhibitorji sintaz dušikovega oksida	36
3.5 Spinski lovilec	36
3.6 Priprava vzorcev za meritve EPR.....	37
3.7 Meritve EPR	37
3.8 Meritve plazemske koncentracije TNF-alfa in nitrita/nitrata	38
3.9 Gojiščna preiskava brisov ustne votline	39
3.10 Histološka ocena obzobnih tkiv.....	39

3.11 Imunohistokemijsko določanje iNOS v pljučih, jetrih in ledvicah	40
3.12 Statistična analiza	40
4 REZULTATI.....	42
4.1 Akutna okužba s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	42
4.1.1 Plazemska koncentracija nitrita/nitrata.....	42
4.1.2 Spektri EPR organov miši iz kontrolnih skupin	42
4.1.3 Spektri EPR organov miši, okuženih s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	42
4.2 Kronična okužba s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	45
4.2.1 Brisi ustne votline	45
4.2.2 Histološka ocena obzobnih tkiv.....	45
4.2.3 Plazemska koncentracija TNF-alfa in nitrita/nitrata.....	46
4.2.4 Spektri EPR organov	48
4.2.5 Imunohistokemijsko določanje iNOS v pljučih, jetrih in ledvicah	50
5 DISKUSIJA.....	53
5.1 Sistemska raven dušikovega oksida v akutni fazi po peroralni okužbi s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	53
5.2 Sistemska raven dušikovega oksida pri ponavljajoči se peroralni okužbi s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	56
5.3 Nitrit/nitrat kot možen kazalec sistemskega nastajanja dušikovega oksida pri peroralnih okužbah s <i>Porphyromonas gingivalis</i>	59
5.4 Uporaba inhibitorjev sintaz dušikovega oksida.....	60
6 SKLEPI	62
7 POVZETEK.....	64
8 SUMMARY	66
9 ZAHVALE	68
10 LITERATURA	70
11 PRILOGE.....	82
11.1 Vsebnost dušikovega oksida v organih miši in plazemska koncentracija nitrita/nitrata pri posameznih živalih, vključenih v študijo akutne okužbe s <i>P. gingivalis</i>	82
11.2 Vsebnost dušikovega oksida v organih miši, plazemska koncentracija nitrita/nitrata in TNF- α ter imunohistokemijska analiza ledvic pri posameznih živalih, vključenih v študijo kronične okužbe s <i>P. gingivalis</i>	83
11.3 Objavljeni ali v objavo sprejeti znanstveni članki	

KAZALO SLIK

SLIKA 1: Shema potencialnih možnosti pretvorb NO v organizmu (povzeto po Byrne Habič in sod., 2004).....	18
SLIKA 2: Mononitrozil – železov – ditiokarbamatni kompleks $Fe^{2+}NO(DETC)_2$	23
SLIKA 3: Značilen $FeNO(DETC)_2$ spekter EPR (puščice), ki se prekriva z osnovnim spektrom jeter miši (Swartz, 1972), izmerjen pri (A) kontrolni miši, (B) kontrolni miši, tretirani s spinskim lovilcem, in (C) z 10^8 CFU <i>E. coli</i> okuženi miši, tretirani s spinskim lovilcem (meritev pri 130 °K, g = 2.04, h – višina signala, B – gostota magnetnega polja) (Nemeč in sod., 2009).....	38
SLIKA 4: Obzobna tkiva pri okuženi živali iz 6. skupine. V subepitelnem žilnem pletežu so polimorfonuklearni levkociti (➡). Izgube epitelnega prirastišča ni (↓ označuje cementno-skleninsko mejo). K–čeljustna kost, D–dentin, P–zobna pulpa. Hematoksilin in eozin, 20-kratna povečava.....	45
SLIKA 5: Imunohistokemijsko določanje iNOS (celice pozitivne na iNOS so obarvane intenzivno rjavo, jedra celic so obarvana s hematoksilinom). a–mikrofotografija pljuč, pozitivna imunohistokemijska reakcija na iNOS v mišični plasti večjih žil (Ž). B–svetlina bronha, 40-kratna povečava. b–mikrofotografija jeter, izrazitejše obarvanje celic okrog centralnih ven (CV), 200-kratna povečava. c–mikrofotografija ledvične skorje, celice pozitivne na iNOS v distalnih tubulih (G–glomerul, P–proksimalni tubul, D–distalni tubul, ↓ označuje ledvično kapsulo).....	52

KAZALO TABEL

TABELA 1: Skupine živali v študiji akutne okužbe s <i>P. gingivalis</i>	33
TABELA 2: Skupine živali v študiji kronične okužbe s <i>P. gingivalis</i>	35
TABELA 3: Normirani rezultati meritev višine signala $FeNO(DETC)_2$ (vsebnosti NO) v organih miši in rezultati meritev plazemske koncentracije NOx pri miših, vključenih v študijo akutne okužbe s <i>P. gingivalis</i>	82
TABELA 4: Normirani rezultati meritev višine signala $FeNO(DETC)_2$ (vsebnosti NO) v organih in rezultati meritev plazemske koncentracije NOx in TNF- α ter rezultati imunohistološke analize ledvic (0 – iNOS v ledvici ni prisotna, 1 – imunohistokemijsko zaznana prisotnost iNOS v ledvici) pri miših, vključenih v študijo kronične okužbe s <i>P. gingivalis</i>	83

KAZALO GRAFOV

GRAF 1: S časom povezano nastajanje NOx v plazmi (1a) in NO v različnih organih (1b do 1h) okuženih miši. *Statistično značilna razlika med neokuženimi (skupina II) in okuženimi (skupina III) mišmi. Krogi in trikotniki prikazujejo mediane vrednosti NOx ali NO, minimalna in maksimalna odstopanja pa so prikazana z daljicami. Število miši, pri katerih smo NOx izmerili v plazmi ali NO v organih, ter število vseh testiranih vzorcev je prikazano kot a/b nad daljico maksimalnega odstopanja. Število testiranih vzorcev zaradi izključitve poškodovanih vzorcev ne ustreza vedno številu živali v določeni skupini.....	44
GRAF 2: Plazemska koncentracija TNF- α . Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev plazme, v katerih smo zaznali TNF- α ter število testiranih vzorcev.....	46
GRAF 3: Plazemska koncentracija NOx. *Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in skupino s <i>P. gingivalis</i> okuženih živali (6. skupina). **Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in kontrolno skupino živali, tretirano s 1400W (5. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in kontrolno skupino živali, tretirano z L-NAME (4. skupina). Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev plazme, v katerih smo zaznali NOx ter število testiranih vzorcev.....	47
GRAF 4: Relativna vsebnost NO v organih kontrolnih in s <i>P. gingivalis</i> okuženih miši. Vpliv iNOS selektivnega inhibitorja 1400W. *Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi (6. skupina). **Statistično značilna razlika med s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi (6. skupina) in s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi, tretiranimi s 1400W (8. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in kontrolnimi živalmi, tretiranimi s 1400W (5. skupina). Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev organov, v katerih smo zaznali NO, ter število testiranih vzorcev.....	49
GRAF 5: Relativna vsebnost NO v organih kontrolnih in s <i>P. gingivalis</i> okuženih miši. Vpliv neselektivnega NOS inhibitorja L-NAME. *Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi (6. skupina). **Statistično značilna razlika med s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi (6. skupina) in s <i>P. gingivalis</i> okuženimi živalmi, tretiranimi z L-NAME (7. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in kontrolnimi živalmi, tretiranimi z L-NAME (4. skupina).	

Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev organov, v katerih smo zaznali NO, ter število testiranih vzorcev. 50

OKRAJŠAVE

1400W	((N-(3-)aminometil)benzil)acetamidin, selektivni inhibitor iNOS
ATCC	angl. American Type Culture Collection
BH ₄	tetrahidrobiopterin
BHI(A)	gojišče (angl. Brain Heart Infusion (Agar))
CD	molekula na površini celic (angl. Cluster of Differentiation), receptor ali ligand
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
cGMP	ciklični gvanozin monofosfat
DETC	dietilditiokarbamat
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
eNOS	endotelna sintaza dušikovega oksida
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
GC	gvanilat ciklaza
GTP	gvanozin trifosfat
Hb	hemoglobin
i.p.	intraperitonealno
i.v.	intravensko
IFN	interferon
IL	interlevkin
iNOS	inducibilna (sprožljiva) sintaza dušikovega oksida
L-NAME	N _o -nitro-L-arginin metil ester, neselektivni inhibitor NOS
LPS	lipopolisaharid
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. Messenger Ribonucleic Acid)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NF	transkripcijski dejavnik–nuklearni faktor (angl. Nuclear Factor)
nNOS	nevronalna sintaza dušikovega oksida
NO	dušikov oksid
NOS	sintaza dušikovega oksida (angl. Nitric Oxide Synthase)
NO _x	skupni nitrit in nitrat (nitrit/nitrat)
p.o.	peroralno

PIP3	fosfatidilinozitol trifosfat
PMN	polimorfonuklearne celice (levkociti)
RNS	reaktivne dušikove zvrsti (angl. Reactive Nitrogen Species)
s.c.	podkožno
SOD	superoksidna dismutaza
SPF	prost specifičnih patogenih klic (angl. Specific Pathogen Free)
TBS	tris pufer (angl. Tris-Buffered Saline)
TLR	receptor TLR (angl. Toll-like receptor)
TNF α	dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. Tumor Necrosis Factor Alpha)
TNFR	receptor za TNF α

VPLIV PERORALNE OKUŽBE Z BAKTERIJO *Porphyromonas gingivalis* NA SISTEMSKO RAVEN DUŠIKOVEGA OKSIDA PRI MIŠIH

IZVLEČEK

Ključne besede: Bakterijske infekcije – imunologija; *Porphyromonas gingivalis* – patogenost – imunologija; dušikov oksid – kri – biosinteza – imunologija; elektronska paramagnetna resonanca; modeli, živalski; miši.

Izhodišča: *Porphyromonas gingivalis*, pomemben povzročitelj parodontalne bolezni, lahko izzove tudi sistemski imunski odziv. *P. gingivalis* sproža nastajanje dušikovega oksida (NO) v različnih celicah imunskega sistema kot tudi v drugih celicah, zato je NO najverjetneje vpleten v sistemski imunski odziv pri peroralni okužbi s *P. gingivalis*. Slednje smo želeli preveriti v t.i. akutnem in kroničnem modelu študije systemskega NO odziva na peroralno okužbo miši s *P. gingivalis*.

Materiali in metode: Osemnajst BALB/c miši ženskega spola smo peroralno okužili z 0,1 ml suspenzije živih bakterij *P. gingivalis* ATCC 33277 (10^9 CFU/ml). V različnih obdobjih po okužbi smo v plazmi miši merili koncentracijo nitrita in nitrata (NO_x), v pljučih, aorti, srcu, jetrih, vranici, ledvicah in v možganih pa z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) količino NO. Da bi ocenili akutni odziv na peroralno okužbo s *P. gingivalis*, smo zbrane podatke primerjali s tistimi, ki smo jih dobili z meritvami pri 11 kontrolnih živalih.

V t.i. kronični model študije, ki je trajala 42 dni, smo vključili šest skupin BALB/c miši, ki smo jih trikrat zapored v presledku 48 ur (to je na dan 0, 2 in 4 poskusa) okužili bodisi z živimi bakterijami *P. gingivalis* ATCC 33277 ali s sterilnim gojiščem. Pri štirih skupinah živali smo v zadnjem tednu poskusa uporabili neselektivni NOS inhibitor L-NAME ali iNOS selektivni inhibitor 1400W. Dve skupini sta služili kot ničelni kontrolni skupini. Dvainštirideseti dan poskusa smo odvzeli kri za določanje TNF- α in NO_x ter organe za meritve NO ter za histološke in imunohistokemijske (iNOS) preiskave.

Rezultati: Pri študiju akutne faze okužbe je bila plazemska koncentracija NO_x statistično značilno ($p = 0.017$) nižja 7, 13 in 25 ur po okužbi s *P. gingivalis*. Podoben trend smo zaznali v nastajanju NO v organih, čeprav razlike med kontrolnimi in okuženimi živalmi niso bile statistično značilne. Korelacija med plazemsko koncentracijo NO_x in NO v organih je bila statistično značilna za jetra (Spearmanov korelacijski koeficient = 0.81, $p = 0.0025$).

Pri živalih, ki smo jih večkrat okužili s *P. gingivalis*, po 42 dneh nismo ugotovili znakov vnetja dlesni, kljub temu pa smo v plazmi določili statistično značilno ($p = 0.028$) zvečano koncentracijo NOx in TNF- α ($p = 0.079$) v primerjavi s kontrolnimi živalmi, pri čemer je uporaba 1400W koncentracijo NOx pri okuženih živalih zmanjšala. Podoben trend smo opazili v nastajanju NO v organih. Pri tem je bila količina NO statistično značilno višja v jetrih ($p = 0.017$) in ledvicah ($p = 0.027$) okuženih živali. Ob uporabi 1400W pa je raven NO v organih statistično značilno upadla v aorti ($p = 0.008$) in ledvicah ($p = 0.046$). Kontrolne miši, tretirane s 1400W, so imele statistično značilno višjo koncentracijo NOx v plazmi ($p = 0.004$) in NO v jetrih ($p = 0.04$) v primerjavi s kontrolnimi živalmi, ki niso bile tretirane z ničimer. Ob uporabi L-NAME pa je bila poleg plazemske koncentracije NOx ($p = 0.006$) zvečana tudi količina NO v pljučih ($p = 0.018$), srcu ($p = 0.037$), jetrih ($p = 0.029$) in ledvicah ($p = 0.029$).

Korelacija med plazemsko koncentracijo NOx in NO v organih je bila statistično značilna v pljučih (0.35, $p = 0.032$) in ledvicah (0.47, $p = 0.003$). Imunohistokemijska analiza je potrdila prisotnost iNOS v različnih tkivih živali vseh skupin.

Zaključek: Sistemska raven dušikovega oksida je v akutni fazi po peroralni okužbi s *P. gingivalis* zmanjšana, pri ponavljajoči se peroralni okužbi pa zvečana, pri čemer NO najverjetneje izvira iz iNOS. Iz rezultatov lahko sklepamo, da zmanjšanje sistemske ravni NO v akutni fazi odziva na okužbo kaže na prehodno toleriranje gostitelja na peroralno okužbo s *P. gingivalis*, kar najverjetneje olajša bakterijsko kolonizacijo tkiv.

THE EFFECT OF ORAL INOCULATION WITH *Porphyromonas gingivalis* ON SYSTEMIC NITRIC OXIDE LEVELS IN MICE

ABSTRACT

Key words: Bacterial infections – immunology; *Porphyromonas gingivalis* – pathogenicity – immunology; nitric oxide – blood – biosynthesis – immunology; electron spin resonance spectroscopy; models, animal; mice.

Background: *Porphyromonas gingivalis*, an important periodontal pathogen, can also induce host responses in distant tissues. *P. gingivalis* induces nitric oxide (NO) production in immune and non-immune system cells; therefore NO is most likely involved in the systemic host response to peroral infection with *P. gingivalis*. Acute and chronic systemic NO host response was investigated in the present study in mice orally inoculated with *P. gingivalis*.

Methods: Eighteen female BALB/c mice were perorally inoculated with 0.1 ml suspension of live *P. gingivalis* ATCC 33277 (10^9 CFU/ml) for evaluation of the acute systemic host response. Plasma nitrite and nitrate (NO_x) and NO production in lungs, aorta, heart, liver, spleen, kidneys and brain were measured using electron paramagnetic resonance (EPR) at intervals after inoculation and compared with levels in 11 control animals.

The chronic response was investigated in six groups of BALB/c mice inoculated orally with either live *P. gingivalis* ATCC 33277 or sterile broth on days 0, 2 and 4, with or without later administration of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors (two groups each using nonselective and iNOS selective inhibitors, L-NAME and 1400W respectively). Two additional groups of animals were used as zero-control groups. Plasma and tissues were harvested on day forty-two for TNF- α , NO_x and tissue NO assay or histology and iNOS immunohistochemistry.

Results: In the study of the acute systemic host response to oral *P. gingivalis* inoculation NO_x levels were significantly ($p = 0.017$) lower at 7, 13 and 25 hours after *P. gingivalis* inoculation. A similar trend in NO production occurred in most tested organs, but never reached statistical significance. The correlation between NO_x in plasma and NO in liver was positive (Spearman correlation coefficient = 0.81, $p = 0.0025$).

No signs of gingivitis were observed after 42 days in mice repeatedly challenged with *P. gingivalis*, but plasma NO_x was significantly elevated ($p = 0.028$) as was TNF- α ($p = 0.079$) in *P. gingivalis*-inoculated animals compared to controls, NO_x being reduced only when

1400W was used. NO production in organs showed a similar trend, with significant elevation in liver ($p = 0.017$) and kidneys ($p = 0.027$), whilst concomitant treatment of inoculated animals with 1400W caused significant reductions in NO in aorta ($p = 0.008$) and kidneys ($p = 0.046$). Sham-inoculated-1400W-treated animals had significantly increased plasma NOx ($p = 0.004$) and liver NO ($p = 0.04$), while those treated with L-NAME had significantly increased plasma NOx ($p = 0.006$) and lung ($p = 0.018$), heart ($p = 0.037$), liver ($p = 0.029$) and kidney ($p = 0.029$) NO.

NOx in plasma correlated significantly with NO production in lungs (0.35, $p = 0.032$) and kidneys (0.47, $p = 0.003$). Immunohistochemistry demonstrated iNOS activity in many tissues in all groups of animals.

Conclusion: Systemic nitric oxide levels are reduced in the acute phase following peroral *P. gingivalis* inoculation, but they are elevated after repeated peroral challenge, NO most likely deriving from iNOS. We can therefore assume, that reduced nitric oxide levels in the acute phase of the response might indicate tolerance of the body to the presence of the organism allowing greater colonisation of tissues with *P. gingivalis*.

1 UVOD

Prosti radikal dušikovega oksida (NO) je pomembna znotrajcelična in medcelična sporočevalna molekula (Deora in Lander, 2000), ki je v organizmu vedno prisotna v majhnih količinah, saj nastaja stalno na konstitutivnih izooblikah sintaz dušikovega oksida – endotelni (eNOS) in nevronske (nNOS) (Thippeswamy in sod., 2006). Večje količine NO lahko nastajajo lokalno ali sistemsko z aktiviranjem sprožljive (inducibilne) sintaze dušikovega oksida (iNOS) zaradi izpostavljenosti organizma bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) ali citokinom (Plonka in sod., 2003; Thippeswamy in sod., 2006). Povečano nastajanje NO učinkuje lahko tudi toksično in vodi v poškodbe tkiv zaradi nitrozacije in oksidacije biomakromolekul, tudi zaradi nastajanja reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS) (Wink in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999a; Miranda in sod., 2000; Plonka in sod., 2003).

Sistemski dvig in učinki NO so dobro preučeni pri septičnem šoku, povzročnem z intraperitonealno (i.p.) (Plonka in sod., 2003; Berliner in Fujii, 2004) ali intravensko (i.v.) (Lai in Komarov, 1994) okužbo z bakterijo *Escherichia coli* ali njenim LPS. Kljub temu pa je ustna votlina pogosto vstopno mesto za številne bakterije. Bakterije in/ali njihovi produkti se lahko požirajo in vdihavajo. Pri tem celo vstopajo v krvni obtok ter se tako razširjajo sistemsko in vplivajo na številne organe in tkiva (Scannapieco, 1999; Yoshino in sod., 1999). Sistemski imunski odziv s povečanim nastajanjem NO je zato pri peroralnih okužbah s po Gramu negativnimi bakterijami zelo verjeten, zlasti ker je poznano, da lokalno nastaja NO pri različnih kroničnih vnetjih, tudi pri paradontalni bolezni (Brennan in sod., 2003; Skalerič in sod., 2006). Toda raziskav s tega področja ni.

V študijo smo vključili tudi zaviralce NOS z namenom, da se določi, katere izooblike NOS so dejansko vpletene v odziv, raziskovanje učinkov zaviralcev NOS pa je zanimivo tudi zato, da bi se uporabili kot zdravilo (Wu in Thiemermann, 1996; Di Paola in sod., 2004; Kawashima in sod., 2005; Leitao in sod., 2005; Paquette in sod., 2006).

Prav tako smo merili količino nitritov in nitratov (NO_x) v plazmi kot kontrolno metodo meritvam NO v organih. Zaradi njihovega sorazmerno enostavnega določanja bi lahko bila metoda primeren kazalec sistema nastajanja NO pri peroralnih okužbah.

1.1 Namen raziskave

Z raziskavo smo želeli:

- ovrednotiti količino NO v pljučih, torakalni aorti, srcu, jetrih, vranici, ledvicah in možganih miši bodisi akutno ali kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis* v primerjavi z zdravimi mišmi;
- ovrednotiti količino nitrita/nitrata (NO_x) v krvi miši bodisi akutno ali kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis* v primerjavi z zdravimi mišmi;
- ovrednotiti izražanje iNOS v ledvicah in jetrih miši kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis* v primerjavi z zdravimi mišmi;
- ovrednotiti učinke inhibitorjev NOS na raven NO v tkivih, NO_x v krvi in izražanje iNOS v tkivih miši kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis* v primerjavi z zdravimi mišmi;
- ovrednotiti učinke inhibitorjev NOS na klinično stanje obzobnih tkiv pri miših kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis* v primerjavi z zdravimi mišmi;
- določiti stopnjo napredovanja paradontalne bolezni s histološkim pregledom obzobnih tkiv miši kronično peroralno okuženih z bakterijo *P. gingivalis*.

Namen raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:

1. Pri akutni peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* se sistemsko poveča nastajanje NO, vendar je zaradi razlik v biološki aktivnosti med LPS *E. coli* in LPS *P. gingivalis* manjše kot pri akutni peroralni okužbi z *E. coli*. Ker NO nastaja tudi na konstitutivnih izooblikah NOS (eNOS in nNOS), se v tkivih tudi zazna osnovna raven tega radikala.
2. Pri kronični peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* se sistemsko poveča nastajanje NO.
3. Ker NO prehaja iz tkiv v kri in ne obratno, je merjenje količine NO_x, ki so presnovki NO v plazmi, ustrezna kontrola meritvam NO v tkivih. Raven NO_x v plazmi je pri kronični okužbi s *P. gingivalis* povišana. Poleg z okužbo povezanega nastajanja NO k povišanju NO_x v plazmi prispeva v veliki meri tudi prehrana, zato pričakujemo tudi pri neokuženih miših zaznavno količino NO_x v plazmi.

4. Lipopolisaharid in citokini spodbujajo izražanje iNOS v tkivih in s tem nastajanje NO, zato se pričakuje povečano izražanje iNOS v tkivih miši, kronično peroralno okuženih s *P. gingivalis*.

5. Pri okuženih miših, tretiranih z inhibitorji NOS, se nastajanje NO v organih in NO_x v plazmi zmanjša, najverjetneje pa zaradi kratkotrajne uporabe inhibitorji ne bodo bistveno vplivali na potek bolezni oziroma na samo zmanjšanje izgube čeljustne kosti.

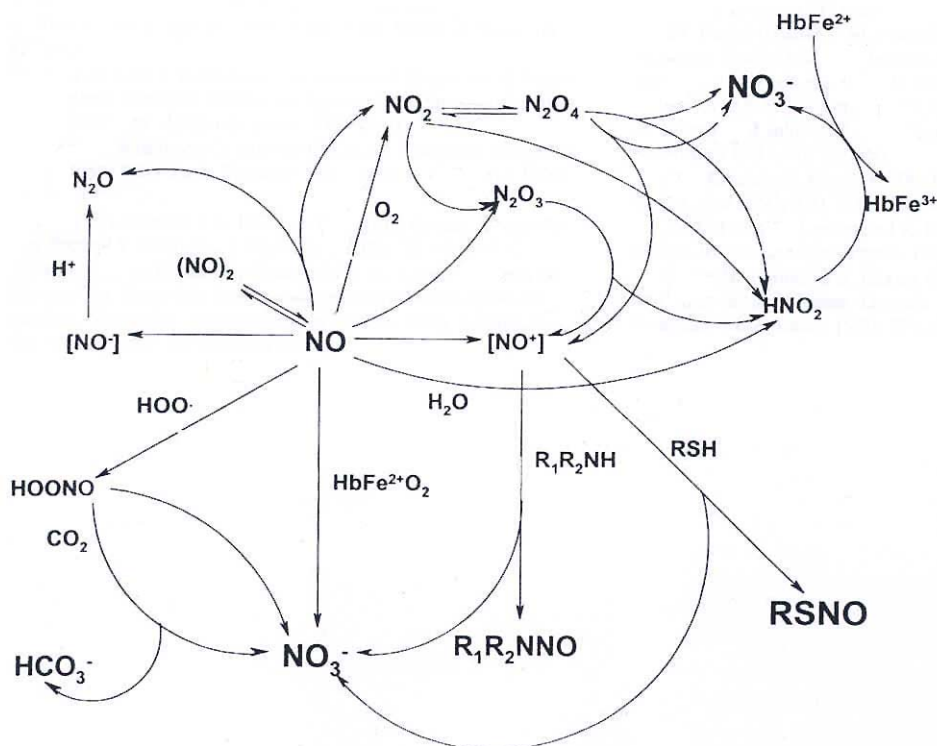
2 PREGLED LITERATURE

2.1 Vloga dušikovega oksida v bioloških sistemih

2.1.1 Lastnosti in kemična reaktivnost dušikovega oksida

Dušikov oksid (dušikov monoksid, pogosto označen kot NO ali natančneje NO[•]) je brezbarven, bolj kot kisik lipofilen, reaktiven, v prisotnosti kisika neobstojeen paramagneten škodljiv plin, ki hkrati deluje kot signalna molekula v medceličnem sporočanju (Voet in Voet, 1995; Fukuto in sod., 2000; Byrne Habič in sod., 2004). Dušikov oksid igra številne fiziološke vloge v centralnem in perifernem živčnem sistemu, v žilnem sistemu, endokrinem sistemu, pri nadzoru gladkih mišic sečil, v uravnavanju spolnega ciklusa in pri erekciji ter uravnavanju gastrointestinalne funkcije in vazodilatacije v pljučih. Dušikov oksid sodeluje pri nadziranju agregacije trombocitov, uravnavanju kontraktilnosti srca in je vpleten v delovanje imunskega sistema. Prav tako je pomemben v vrsti patofizioloških procesov (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Byrne Habič in sod., 2004; Thippeswamy in sod., 2006). Dvojna vloga NO – kot varovalna ali kot toksična molekula – je odvisna od vpletene izooblike NOS, koncentracije NO, tipa celic, v katerih NO nastaja, dostopnosti substrata L-arginina, tvorbe cikličnega gvanozin monofosfata (cGMP) in celotnega stanja okolja v celici in zunaj nje (Miranda in sod., 2000; Thippeswamy in sod., 2006).

Dušikov oksid je le ena od več med seboj izmenljivih redoksnih stanj dušikovega monoksida, ki vključuje tudi nitrozilni kation NO⁺ in nitroksilni anion NO⁻, vsi pa so zelo reaktivne zvrsti (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Byrne Habič in sod., 2004; Pollard in Earnshaw, 2004). V organizmu so zlasti pomembne reakcije NO s kisikom, tioli in kovinskimi kompleksi ter tvorba reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS), ki posredno spreminjajo biomakromolekule (Wink in sod., 1996; Fukuto in sod., 2000; Byrne Habič in sod., 2004). Fiziološka koncentracija NO v organizmu je med 1–10 nM (Halliwell in Gutteridge, 1999a), odvisno od prehrane. Ker v telesu hitro kemično reagira z drugimi molekulami, je njegova razpolovna doba le nekaj sekund (Grisham in sod., 1996). Zato je za fiziološke učinke pomembno, da stalno nastaja (Pollard in Earnshaw, 2004). Izloča se po presnavljanju v nitrat in nitrit (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Byrne Habič in sod., 2004; Pollard in Earnshaw, 2004). Dušikov oksid hitro difundira preko celičnih membran (Lancaster, 2000) ter kljub veliki reaktivnosti lahko doseže razdalje do 1 mm od mesta nastajanja (Voet in Voet, 1995; Lancaster, 1996).



Slika 1: Shema potencialnih možnosti pretvorb NO v organizmu (povzeto po Byrne Habič in sod., 2004).

2.1.2 Nastajanje dušikovega oksida v organizmu

Dušikov oksid lahko nastaja neencimsko. V celicah pa v glavnem nastaja v encimski reakciji, ki jo katalizira sintaza dušikovega oksida (NOS) (Voet in Voet, 1995; Masters, 2000; Byrne Habič in sod., 2004). Pri tem iz L-arginina v reakciji, ki je odvisna od nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), in ob porabi kisika nastajata L-citrulin in NO ali NO⁻, v nekaterih izjemnih primerih pa lahko nastaja celo superoksid (Alderton in sod., 2001). Vsaka podenota NOS vsebuje po en flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), tetrahydrobiopterin (BH₄) in Fe(III)-hem kofaktorje, ki omogočajo 5-elektronsko oksidacijo L-arginina (Voet in Voet, 1995; Masters, 2000; Alderton in sod., 2001). V procesu dvostopenjske oksidacije nastaja intermediat N^ω-hidroksi-L-arginin (Alderton in sod., 2001; Byrne Habič in sod., 2004).

Sintaza dušikovega oksida je flavohemski encim, ki z dimerizacijo dveh podenot postane katalitično aktiven. Vsaka podenota ima na karboksilnem koncu flavin-reduktazno domeno, na amskem koncu pa oksigenazno domeno, med katerima poteka prenos elektronov (Alderton in sod., 2001). Za stabilnost dimera je najverjetneje ključen cinkov ion v kompleksu s štirimi tiolnimi skupinami (Masters, 2000; Byrne Habič in sod., 2004). Pri vretenčarjih so

poznane tri izooblike NOS, ki so si podobne glede prostetičnih skupin in osnovnih kemijskih mehanizmov, razlikujejo pa se glede aminokislinske sestave, molekulske mase in regulacijskih mehanizmov (Masters, 2000). Endotelijska (eNOS) in nevronska (nNOS) izooblika se izražata stalno, inducibilna (iNOS) pa naj bi bila večinoma odgovorna za povečano nastajanje NO in njegove citotoksične in citostatične učinke kot odziv na prisotnost zlasti LPS in citokinov (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Kleinert in sod., 2000; Pollard in Earnshaw, 2004). Čeprav pa iNOS ne najdemo le v makrofagih, kjer je zlasti pri miših in podganah močno vpletena v tvorbo NO pri vnetjih, temveč tudi v jetrnih celicah, normalnem pljučnem epitelu in fibroblastih. Endotelno NOS najdemo v endotelnih celicah in nekaterih nevronih ter epitelnih celicah, kardiomiocitih, megakariocitih, trombocitih ter T-celicah. Nevronska NOS pa se izraža v centralnem in perifernem živčnem sistemu, skeletnih mišičnih celicah, epitelnih celicah, mastocitih in nevtrofilcih (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Kleinert in sod., 2000).

Konstitutivni NOS se v večini tkiv aktivirata ob povečanju koncentracije Ca^{2+} prek interakcije s Ca^{2+} -kaldmodulinom (Voet in Voet, 1995; Pollard in Earnshaw, 2004), kar olajša prenos elektronov od reduktazne na oksigenazno domeno (Alderton in sod., 2001). Endotelna NOS se aktivira tudi po fosforilaciji s protein kinazo B/Akt, ki jo aktivira fosfatidilinozitol trifosfat (PIP3) – derivat membranskih lipidov, ki nastaja pod vplivom strižnih sil na endotel zaradi pretoka krvi (Alderton in sod., 2001; Pollard in Earnshaw, 2004; Sessa, 2005). Nasprotno pa fosforilacija zavira dejavnost nNOS (Alderton in sod., 2001). Pri vnetju aktivira eNOS interakcija z beljakovino (heat shock proteinom 90 – hsp90) (Alderton in sod., 2001; Sessa, 2005), inhibira pa interakcija z membransko beljakovino kaveolinom 1 (Byrne Habič in sod., 2004; Sessa, 2005). Na izražanje eNOS vplivajo tudi hipoksija, rastni dejavniki ter oksidirani lipoproteini nizke gostote (LDL) (Kleinert in sod., 2000). Izražanje nNOS je odvisno od neurotransmiterjev ter številnih fizikalnih dražljajev (Kleinert in sod., 2000). Poleg tega se nastajanje NO zlasti pri nNOS in eNOS uravnava z negativno povratno zanko; NO se veže na hemsko železo v oksigenazni domeni NOS in prepreči vezavo kisika (Alderton in sod., 2001). Izražanje NOS je odvisno tudi od hormonov (Kleinert in sod., 2000; Verthelyi, 2006). Bakterijski LPS in citokini lahko zavrejo izražanje nNOS in eNOS v nekaterih celicah, medtem ko ga v drugih spodbujajo (Kleinert in sod., 2000).

Sprožljiva iNOS je Ca^{2+} -kaldmodulin-neodvisna NOS, saj kaldmodulin tesno veže tudi brez kalcijevih ionov (Halliwell in Gutteridge, 1999a; Byrne Habič in sod., 2004). Izražanje iNOS se poveča pod vplivom aktiviranega transkripcijskega dejavnika NF- κ B (zaradi delovanja LPS, nekaterih virusov, ultravijoličnega sevanja in sevanja gama ter nastajanja IL-1,

interferona gama ($\text{IFN}\gamma$) ali $\text{TNF}\alpha$ se odcepi inhibicijska podenota I κ B), ki vstopa v jedro celic (Wu in Thiernemann, 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999b; Ganster in Geller, 2000; Jean-Baptiste, 2007). Nastali NO pa lahko deloma tudi zavira aktiviranje transkripcijskega dejavnika NF- κ B in tako tudi zmanjšuje izražanje adhezijskih molekul za fagocite na endotelnih celicah (Halliwell in Gutteridge, 1999d; Kleinert in sod., 2000). Prepisovanje informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) za iNOS je lahko tudi posledica aktiviranja signalne poti Jak-Stat zaradi stimulacije z interferonom gama ($\text{IFN}\gamma$) ter aktivacije drugih signalnih poti (Ganster in Geller, 2000; Kleinert in sod., 2000). Več ur po izpostavitvi citokinom in/ali endotoksinom pričnejo stimulirane celice dolgotrajno izločati povečane količine NO (Voet in Voet, 1995; Miranda in sod., 2000), čeprav je opisano tudi konstitutivno izražanje iNOS (Kleinert in sod., 2000). Izražanje gena za iNOS zavirajo številne snovi, kot na primer glukokortikoidi, nesteroidna protivnetna zdravila, interlevkini IL-4, IL-10, IL-13 ter inzulin (Wu in Thiernemann, 1996; Ganster in Geller, 2000; Kleinert in sod., 2000). Transkripcija informacijske ribonukleinske kisline (mRNA) za iNOS se v različnih tipih celic uravnava različno (Ganster in Geller, 2000). Aktivnost NOS je odvisna tudi od umeščenosti in izražanja različnih posttranskripcijskih cepnih oblik (Alderton in sod., 2001).

2.1.3 Biološki učinki dušikovega oksida

Glavna tarča za fiziološke koncentracije NO v celicah je gvanilat ciklaza (GC), ki katalizira pretvarjanje gvanozin trifosfata (GTP) v sekundarno znotrajcelično sporočevalno molekulo ciklični gvanozin monofosfat (3',5' – cGMP) (Deora in Lander, 2000; Miranda in sod., 2000). Ciklični GMP je nadalje odgovoren za aktiviranje protein kinaz, ionskih kanalov, odvisnih od cikličnih nukleotidov in fosfodiesteraze (Pollard in Earnshaw, 2004; Thippeswamy in sod., 2006). Dušikov oksid deluje tako, da se veže na železo v hemske prostetične skupine gvanilat ciklaze (GC). Nastane nitrozohem, ki povzroči konformacijsko spremembo encima, zaradi česar se aktivnost encima gvanilat ciklaze (GC) poveča (Voet in Voet, 1995; Byrne Habič in sod., 2004; Pollard in Earnshaw, 2004). Dušikov oksid oziroma reaktivne dušikove zvrsti (RNS) lahko vplivajo tudi na druge proteine (npr. železo-žveplovi proteini, tioli, hem-proteini) zaradi vezave ali kovalentne modifikacije le-teh, a je fiziološki pomen teh učinkov manj znan (Deora in Lander, 2000; Pollard in Earnshaw, 2004; Thippeswamy in sod., 2006). Večina bioloških učinkov je posledica kombiniranega delovanja NO iz vseh treh izooblik NOS (Persichini in sod., 2006; Thippeswamy in sod., 2006).

Na eNOS nastali NO učinkuje zlasti v srčno-žilnem sistemu, kjer sprošča gladke mišice v stenah žil, zavira adhezijo trombocitov in levkocitov, zavira razmnoževanje gladko-mišičnih celic, vpliva na angiogenezo in na izražanje žilno-endotelnega rastnega faktorja (Mravljak in sod., 2005; Thippeswamy in sod., 2006). V živčnem sistemu deluje varovalno (Thippeswamy in sod., 2006).

Dušikov oksid z nNOS v perifernem živčevju sprošča gladke mišice v stenah žil in sfinktrih prebavil, v žolčniku, mehurju, gobastem tkivu ter dihalnih poteh. V centralnem živčnem sistemu pa NO sodeluje pri vedenju, spanju, ravnotežju, koordinaciji gibov in procesih pomnjenja. Je atipični nevrottransmitter. Vpleten je tudi v potek nekaterih neurodegenerativnih bolezni in epilepsije (Mravljak in sod., 2005; Thippeswamy in sod., 2006).

Učinki nNOS in eNOS so lahko celo nasprotujoči si – nNOS ima npr. pozitivni inotropni učinek na srce, eNOS pa zmanjšuje dejavnost srca, kar je najverjetneje posledica različne prostorske porazdelitve izooblik (Mravljak in sod., 2005).

Dušikov oksid iz iNOS je za organizem škodljiv takrat, ko se iNOS aktivira v celicah, ki niso neposredno udeležene pri obrambi organizma, ali ko se iNOS aktivira v odsotnosti mikroorganizmov. Prav tako je škodljiva pretirana tvorba NO pri odzivu na okužbo (Mravljak in sod., 2005; Thippeswamy in sod., 2006). Zaradi prevelikega nastajanja NO pri septičnem šoku lahko pride do cirkulacijskega kolapsa, miokardne disfunkcije, poškodbe organov (zaradi zavore mitohondrijskega dihanja in neposrednih citotoksičnih učinkov) ter sindroma več-organske odpovedi (Wu in Thiemermann, 1996; Kleinert in sod., 2000). Sicer pa je pomemben pri osteoklastni resorpciji kosti, celjenju kožnih ran in črevesne sluznice ter pri zaščiti srca in jeter. Sodeluje pri nastanku in izzvenevanju vnetja (Kleinert in sod., 2000; Mravljak in sod., 2005). Dušikov oksid igra pomembno vlogo v patofiziologiji dihal. Pri astmatikih in bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo se pojavlja zvečana količina NO v izdihanem zraku. Pomemben naj bi bil za bronhodilatacijo. V fizioloških koncentracijah deluje NO protivnetno, ker zavira aktiviranje levkocitov in žilno prepustnost, v povečanih količinah pa spodbuja vnetje preko Th2-limfocitnega odziva in tvorbe drugih toksičnih snovi (Thippeswamy in sod., 2006). Dušikov oksid je pomemben v bolezenskih stanjih, kot so septični šok, vnetne bolezni, možganska kap, diabetes, migrena, bolezni s tumorji, pljučna hipertenzija in ateroskleroza. Inhibiranje nastajanja NO je zato zanimivo tudi z vidika razvijanja zdravil – lovilcev NO in zaviralcev NOS (Wu in Thiemermann, 1996; Kleinert in sod., 2000; Kawashima in sod., 2005; Mravljak in sod., 2005).

2.2 Dokazovanje prisotnosti dušikovega oksida

Dokazovanje NO je možno z neposrednimi ali posrednimi metodami. Neposredne metode obsegajo določanje emisije svetlobe pri reakciji NO z ozonom, uporabo NO elektrod, merjenje spremembe absorbanca po pretvorbi hemoglobina v methemoglobin pri reakciji z NO ter metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR). Posredno pa se nastajanje NO lahko ocenjuje z meritvami nitrita in nitrata ali drugih produktov oksidacije ter s pomočjo inhibitorjev NOS (Halliwell in Gutteridge, 1999c).

2.2.1 Neposredno dokazovanje dušikovega oksida z metodo elektronske paramagnetne resonance

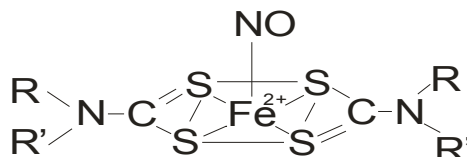
Dušikov oksid ima en nesparjen elektron in je prosti radikal ter paramagnetna molekula. Ker je kratkoživi radikal z razpolovno dobo približno 10 sekund, je potrebno za njegovo dokazovanje z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) uporabljati spinske lovilce (Bonner, 1996; Venkataraman in sod., 2002; Berliner in Fujii, 2004; Byrne Habič in sod., 2004). To so diamagnetne spojine, ki z NO tvorijo stabilne paramagnetne spojine ter podaljšajo obstojnost radikala in povečajo zaznavnost (Vanin in sod., 2002; Venkataraman in sod., 2002). Kot lovilci se lahko uporabljajo železovi kompleksi, ki reagirajo z NO, da nastane železo-nitrozil kompleks. Kot lovilci se uporabljajo hemoglobin ter drugi hemske proteini, železovi ditiokarbamati, nehemski protein lipoksigenaza, feritini, nitronil nitroksidi, helotropi NO in železo-žveplovi centri (Kalyanaraman, 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999c).

V magnetnem polju, ki ga uporabljamo pri meritvah EPR, pride do interakcije magnetnih momentov nesparjenih elektronov nitrozilnih kompleksov z magnetnim poljem in s tem do razcepa energijske ravni elektronov na dve ravni. Energijsko razliko med tema dvema ravnema merimo z EPR. V nitrozilnem kompleksu pa pride dodatno še do interakcije magnetnega momenta elektrona z magnetnim momentom jedra dušika (s spinom $I = 1$), zaradi česar se omenjeni skupini elektronov razdelita še na tri podskupine z različnimi energijami, kar imenujemo hiperfina razcep, značilen za snov (Šentjurc in Štalc, 1976).

Če meritve opravljamo na vzorcih z vodo, so prisotne velike dielektrične izgube, zato je takojšnje zamrzovanje vzorcev v tekočem dušiku primernejše, saj lahko meritve opravimo na večjih vzorcih (Wertz in Bolton, 1972). Obenem je zamrzovanje primernejše tudi z vidika ohranjanja vzorcev in manipuliranja z njimi. Zamrzovanje tudi prepreči nadaljnje reakcije NO z lovilec v tkivu (Vanin in sod., 2002).

2.2.1.1 Železo-nitrozil ditiolni kompleksi - $FeNO(DETC)_2$

Kot spinski lovilec se najpogosteje uporablja kompleks železovih ionov Fe^{2+} in dietilditiokarbamata (DETC), ki je hidrofoben, ali pa kompleks Fe^{2+} in N-metil-d-glukamin ditiokarbamata (MGD), ki je hidrofilen. Dušikov oksid reagira s Fe^{2+} , da nastane železo-nitrozilni kompleks.



Slika 2: Mononitrozil – železov – ditiokarbamatni kompleks $Fe^{2+}NO(DETC)_2$

Ker je NO devetkrat bolj topen v nepolarnih organskih topilih kot v vodi, se smatra, da se NO koncentrira v hidrofobni notranjosti membran, zato naj bi bil hidrofobni lovilec učinkovitejši kot hidrofilni (Lancaster, 2000; Kleschyov in Munzel, 2002).

Ditiolni kompleksi so stabilni v prisotnosti kisika in imajo za NO večjo afiniteto kot za kisik. Kompleksi lovilcev z NO dajejo značilne signale, brez NO pa so železovi kompleksi – lovilci – EPR neaktivni (Kalyanaraman, 1996; Komarov in sod., 2002; Vanin in sod., 2002; Venkataraman in sod., 2002). $Fe^{2+}NO(DETC)_2$ je sorazmerno stabilen v prisotnosti kisika in daje značilen tripletni EPR spekter zaradi hiperfine interakcije z jedrom dušika ($I = 1$) (slika 3). Tripletni EPR signal je karakterističen za $Fe^{2+}NO(DETC)_2$ s parametri EPR pri sobni temperaturi: hiperfini razcep $a_N = 12.7$ G in spektroskopski cepitveni faktor $g_{iso} = 2.04$ G ter pri 100 K $a_N = 13.4$ G ter $g_{\perp} = 2.04$ in $g_{\parallel} = 2.02$ G. Tripletni signal neposredno zrcali absolutno količino $Fe^{2+}NO(DETC)_2$ in torej tudi količino ujetega NO (Suzuki in sod., 1998; Takizawa in sod., 2002; Venkataraman in sod., 2002; Kleschyov in sod., 2003).

Dietilditiokarbamat se uporablja za spremljanje količine NO pri uporabi NO-donorjev ali pri encimskem nastajanju, kjer se lahko spremlja kinetika produkcije (Kalyanaraman, 1996). Večina avtorjev (Lai in Komarov, 1994; Komarov in sod., 1997; Plonka in sod., 2003; Berliner in Fujii, 2004) omenja, da se signal EPR lahko spremlja 30 do 120 minut po uvedbi lovilca.

Čeprav ima $Fe^{2+}(DETC)_2$ veliko dobrih lastnosti kot lovilec NO, moti njegova topnost v vodnih raztopinah (Venkataraman in sod., 2002). Dietilditiokarbamat je vodotopen,

$\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ in $\text{Fe}^{2+}\text{NO}(\text{DETC})_2$ pa sta hidrofobna (Kalyanaraman, 1996; Vanin in sod., 2002; Venkataraman in sod., 2002). V študijah *in vivo* so se zato avtorji (Komarov in sod., 1997; Plonka in sod., 2003; Berliner in Fujii, 2004) odločali za tvorbo $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ kompleksa, ki deluje kot lovilcec *in situ* tako, da so DETC vbrizgali i.p., mešanico železovega sulfata in natrijevega citrata pa hkrati podkožno (s.c.). Endogenemu železu eksogeno dodano železo izboljša lovilne sposobnosti DETC, hkrati pa ne vpliva na nitrozilhemoglobin (HbNO) (Komarov in sod., 1997). Ker pa dodajanje železovih ionov lahko patološko učinkuje predvsem preko Fentonove reakcije, se DETC dodaja v prebitku (Vanin in sod., 2002). Pri tem je potrebno reaktante pripravljati sveže in če se le da v anaerobnih pogojih, da preprečimo konverzijo železa iz Fe^{2+} v Fe^{3+} (Vanin in sod., 2000; Vanin in sod., 2002; Venkataraman in sod., 2002), kar pa je pri rabi hidrofobnega $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ in v aerobnih razmerah v telesu manj verjetno (Vanin in sod., 2000; Kleschyov in Munzel, 2002; Komarov in sod., 2002). Reakcija je vidna, saj se raztopina obarva v živo oranžno ali črno (Vanin in sod., 2002). $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ reagira samo z NO, medtem ko je Fe^{3+} -oblika neselektivna za NO in NO^- (Komarov in sod., 2002). Fe^{3+} -oblike pa lahko molekule NO tudi porabljajo, da nastaja diamagnetni železo-nitrozilni derivat, ki razpada v paramagnetni mononitrozilni kompleks (Vanin in sod., 2000; Vanin in sod., 2002). Slednje pri $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ ni očitno (Mikoyan in sod., 1997; Vanin in sod., 2000).

Kompleksi lovilcev z NO se ne kopičijo enostavno v celicah, pač pa so v določeni meri podvrženi redoksnim reakcijam, zlasti s superoksidom in peroksinitritom, da nastanejo EPR nezaznavni kompleksi (Kleschyov in Munzel, 2002; Vanin in sod., 2002). Obenem se je potrebno zavedati, da se v sistemu prisotni nitrit lahko reducira v NO, ki se nato veže na lovilcec in daje lažno višje rezultate koncentracije NO v sistemu (Kleschyov in Munzel, 2002; Venkataraman in sod., 2002). Ker je reakcija zelo počasna, je nepomembna v živalskih tkivih, *in vivo*, razen pri težkih patoloških stanjih, ko prihaja do ishemije in zakisljevanja tkiv. Zato je pomembno, da se v študije vključijo vzporedne kontrole z uporabo inhibitorjev NOS (Vanin in sod., 2002). Prav tako se z uporabo inhibitorjev NOS izključijo ostali potencialni neencimski viri nastajanja NO (razpad hidroksiuree in drugih dušik-vsebujočih snovi ter S-nitrozotiolov) (Vanin in sod., 2002). Dodaten problem so S-nitrozotiole, ki enako kot NO reagirajo s $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$. Nastane $\text{Fe}^{2+}\text{NO}(\text{DETC})_2$, pri čemer reakcija ne potrebuje dolge inkubacije (Kleschyov in Munzel, 2002).

V študijah je potrebno računati tudi z nasičenjem lovilca, zato moramo lovilcec v sistem vnašati v vsaj trikratnem prebitku glede na pričakovano tvorbo NO (Vanin in sod., 2000; Venkataraman in sod., 2002).

Pri snemanju spektra EPR ob uporabi $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ se pri delu pri sobni temperaturi izognemo dodatnim signalom s strani $\text{Cu}^{2+}(\text{DETC})_2$ ($S=1/2$). Ti lahko zapletajo spekter pri nižjih temperaturah (Vanin in sod., 2000; Kleschyov in Munzel, 2002; Venkataraman in sod., 2002), tako da ostane očitno merljiva le tretja komponenta $\text{Fe}^{2+}\text{NO}(\text{DETC})_2$ spektra pri visokem polju (Plonka in sod., 2003), a se spekter lahko kljub temu ustrezno odčita (Kalyanaraman, 1996; Suzuki in sod., 1998; Takizawa in sod., 2002). Berliner in Fujii (2004) pa ocenjujeta, da je delo pri nizkih temperaturah optimalno. Kompleks z bakrom nastaja, ker DETC ni selektiven za železo in tvori komplekse z di- in trivalentnimi ioni, poleg tega pa DETC dodajamo v prebitku glede na železo (Vanin in sod., 2002). Dietilditiokarbamat tvori tudi kompleks z bakrom v superoksid dismutazi (SOD), kar lahko vpliva na redoksi reakcije v celicah (Kleschyov in Munzel, 2002).

Kljub nekaterim pastem, ki jih raba $\text{Fe}^{2+}(\text{DETC})_2$ pri kvantitativnem preučevanju NO prinaša, so ti lovilci *in vivo* zelo učinkoviti (Mikoyan in sod., 1997; Vanin in sod., 2002; Plonka in sod., 2003).

2.2.2 Posredno dokazovanje dušikovega oksida z meritvijo nitrita in nitrata v plazmi z reakcijo po Griessu

Nitrit in nitrat (NO_x) sta stabilni končni produkt presnove NO in ju zaznavamo v krvi in urinu (Guevara in sod., 1998; Tsikas, 2005). Zaradi hitre oksidacije nitrita v nitrat pa NO_x predstavlja v veliki meri samo nitrat (Veszalovsky in sod., 1995; Ellis in sod., 1998), pri čemer lahko obsežen del izvira iz prehrane (Green in sod., 1981; Ellis in sod., 1998; Halliwell in Gutteridge, 1999c) ter deloma iz bakterijske presnove amino-skupin v prebavni cevi (Grisham in sod., 1996). Nitrat v plazmi/serumu se omenja kot možni kazalec aktivacije imunskega sistema po okužbi z LPS, saj zrcali nastajanje NO v tkivih (Jungersten in sod., 1993; Tracey in sod., 1995; Veszalovsky in sod., 1995; Ellis in sod., 1998; Hayashi in sod., 2005), čeprav so mnenja glede tega deljena (Klebanoff in Nathan, 1993; Tsikas, 2005). Poleg tega naj bi bila zvečana koncentracija nitrata v plazmi povezana zgolj z določenimi patogeni in mesti okužbe (Ahren in sod., 1999). Zvečana koncentracija NO_x v krvi se pojavlja pri številnih infekcijskih in vnetnih boleznih kot npr. pri intersticijski pljučnici (Miyakawa in sod., 2002), diabetesu melitusu (Izumi in sod., 2006), revmatoidnem artritisu, ankilozirajočem spondilitisu, osteoartritisu (Ersoy in sod., 2002), nekaterih kolitisih ter cirozi jeter (Ellis in sod., 1998).

Večina metod za določanje NO_x temelji na reakciji po Griessu (Ellis in sod., 1998; Guevara in sod., 1998; Tsikas, 2005). S to reakcijo se določa nitrit, ki v kisli raztopini reagira s sulfanilno kislino ali sulfanilamidom, nastali vmesni produkt pa reagira z α -naftilaminom ali N-(1-naftil)etilendiaminom in daje obarvan diazo-produkt, ki je stabilen nekaj minut in absorbira svetlobo pri 540 nm (Granger in sod., 1996; Wishnok in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999c; Tsikas, 2005). Metoda je enostavna ter občutljiva na mikromolarne koncentracije nitrita (Tsikas in sod., 1998; Yao in sod., 2004). Ker pa je v telesnih tekočinah večinoma prisoten nitrat, je potrebno pred izvedbo reakcije le-tega reducirati v nitrit z uporabo nitrat-reduktaz ali kovinskih reducentov (Granger in sod., 1996; Wishnok in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1999c; Tsikas, 2005). Plazemske vzorce je potrebno pred analizo deproteinizirati (Ellis in sod., 1998; Guevara in sod., 1998).

Pred analizo vzorcev je potrebno zmanjšati možnost kontaminacije vzorca z nitriti in nitri v laboratorijskih kemikalijah in materialih kot tudi v epruveh za odvzem vzorcev (Tsikas, 2005). Pri tem se etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) omenja kot potencialno problematičen antikoagulant (Tsikas, 2005), čeprav ga drugi raziskovalci priporočajo (Dembny in sod., 1998; Ricart-Jane in sod., 2002). Zaradi kratke obstojnosti nitrita v polni krvi se priporoča čimprejše centrifugiranje krvi pri temperaturi 2–4 °C, pri čemer je lahko hemoliza problem zaradi lažno nizkih rezultatov vrednosti NO_x v plazmi (Ellis in sod., 1998; Tsikas, 2005). Če se vzorci ne uporabijo takoj, jih je nujno shraniti pri temperaturi vsaj –20 °C (Ellis in sod., 1998). Pri analizi, zlasti takrat ko se za redukcijo nitrata v nitrit uporablja kadmij, je lahko problem prisotnost anorganskih (kloridi, fosfati, sulfat) in organskih (alanin, cistein) spojin. Prav tako lahko meritev moti prisotnost L-NAME (Tsikas in sod., 1998; Tsikas, 2005). Nepopolna redukcija nitrata v nitrit ob uporabi kadmija lahko daje lažno nekoliko nižje vrednosti NO_x v plazmi (Tsikas in sod., 1998).

2.2.3 Posredno dokazovanje dušikovega oksida z uporabo inhibitorjev sintaz dušikovega oksida

Inhibitorji NOS reagirajo z NOS na različne načine: lahko so kompetitivni inhibitorji L-arginina, lahko se vežejo na biopterinsko mesto, so hem-vezalni inhibitorji ali inhibitorji flavoproteina in kalmodulina (Alderton in sod., 2001).

Inhibitorji so lahko splošni (na primer NG-nitro-L-arginin metil ester ali L-NAME), delno selektivni za posamezno izoobliko ali visoko selektivni za posamezno izoobliko sintaze

dušikovega oksida (npr. 1400W za iNOS) (Halliwell in Gutteridge, 1999c; Alderton in sod., 2001).

Inhibicija različnih izooblik sintaz kaže različno časovno odvisnost, *in vivo* pa naj bi inhibitor potreboval vsaj 30 minut za pričetek učinkovanja po parenteralnem dajanju, zato je čas dajanja inhibitorjev vprašljiv (Alderton in sod., 2001). Za splošne inhibitorje velja, da v različnih obdobjih zavirajo različne izooblike NOS (Garvey in sod., 1997). Ne glede na čas dajanja pa lahko poslabšajo zdravstveno stanje, ker zavrejo tudi zaščitno delovanje konstitutivnih sintaz (Liaudet in sod., 1998; Suliburk in sod., 2005). Poskusi dajanja so opisani po naslednjih časovnih presledkih: takoj po okužbi (Garvey in sod., 1997; Dambrova in sod., 2003; Suliburk in sod., 2005), 3 ure po okužbi (Garvey in sod., 1997; Suliburk in sod., 2005), 6 in več ur po okužbi (Liaudet in sod., 1998; Takizawa in sod., 2002), medtem ko za 1400W velja, da se ga daje ob okužbi (Garvey in sod., 1997; Suliburk in sod., 2005).

O uporabi inhibitorjev v daljšem obdobju ni veliko znanega. Za 1400W je opisano, da se po 2 urah ne povrne aktivnost iNOS in se inhibitor smatra kot nepovraten ali zelo počasi povraten (Garvey in sod., 1997; Babu in Griffith, 1998). Kljub temu pa se omenja, da 1400W ni več učinkovit po 9 urah (Parmentier in sod., 1999).

Neselektivni inhibitor NOS L-NAME je sicer močan inhibitor NO sinteze v večini tkiv pri zdravih in z LPS stimuliranih živalih (Dambrova in sod., 2003), ni pa znan časovni potek zaviranja. Dolgotrajnejša sistemska raba inhibitorjev (1400W in L-NAME) je opisana v redkih primerih. Možna je bodisi parenteralna ali peroralna uporaba (Babu in Griffith, 1998; Guo in sod., 2006). Za L-NAME so opisani toksični učinki na ledvice in srce pri večtedenski uporabi (Pechanova in sod., 1999; Inada in sod., 2002), medtem ko za 1400W ni podatkov.

Problem uporabe inhibitorjev NOS je tudi, da lahko pri razpadanju neencimsko tvorijo NO v mikromolarnih koncentracijah, kar nasprotuje učinkom inhibicije NOS in je zlasti značilnost L-NAME v prisotnosti L-askorbata (Moroz in sod., 1998). Znano je tudi, da učinkovitost inhibitorjev NOS ni enaka v vseh organih (Kozlov in sod., 2003; Hayashi in sod., 2005), obenem pa je potrebno upoštevati interakcije med izooblikami NOS (Hayashi in sod., 2005; Persichini in sod., 2006).

2.3 Mehanizmi patogenosti bakterije *Porphyromonas gingivalis*

Po Gramu negativna anaerobna bakterija *P. gingivalis* je ena glavnih povzročiteljic parodontalne bolezni. Pri njej se ugotavlja vedno več potencialnih dejavnikov virulence, od katerih se ključna vloga pripisuje LPS (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005).

Parodontalna bolezen prizadene dlesen, pozobnico, cement in čeljustno kost (Wolf in sod., 2005).

Pri kolonizaciji ustne votline imajo pomembno vlogo prej naseljene bakterije, ki ustvarjajo ustrezno mikrookolje in omogočajo pripenjanje *P. gingivalis*, za kar so potrebne fimbrije in proteini zunanje membrane. *P. gingivalis* se lahko pripenja tudi na številne snovi v ustni votlini ter neposredno na celice gostitelja. Poleg fimbrij so za pripenjanje pomembni tudi hemaglutinini (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005). Ko je bakterija v stiku s celico epitela prične izločati številne encime (naprimer zunajcelične proteaze, gingipaine), ki vplivajo na znotrajcelično sporočanje v gostiteljevi celici ter spreminjajo in/ali zavirajo imunski odgovor gostitelja (Lamont in Jenkinson, 1998; Imamura in sod., 2003; Wolf in sod., 2005).

P. gingivalis tvori še številne druge encime in strupene presnovke, ki sami po sebi vplivajo na strukturo gostiteljevih tkiv, obenem pa zavirajo prirojene in pridobljene imunske mehanizme, kar omogoča daljše preživetje bakterije in večjo kolonizacijo ter dodatne poškodbe gostiteljevih tkiv. *P. gingivalis* izloča številne proteaze, ki poleg razgradnje gostiteljevih strukturnih beljakovin zavirajo tudi delovanje polimorfonuklearnih (PMN) levkocitov, inaktivirajo TNF- α ter spreminjajo nevtrofilno elastazo. Poleg proteaz tvori tudi kolagenazo, fosfolipazo A, fosfataze, DNaze in RNaze, sialidaze, hlapne žveplove snovi, butirrat, propionat, indol in amonijak, ki so citotoksični in/ali zavirajo nastajanje beljakovin. Poleg teh lahko na izgubo čeljustne kosti dodatno vplivajo LPS, polisaharidni antigeni, 24-kDa protein zunanje membrane in fimbrije (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005).

P. gingivalis lahko tudi aktivno vstopa v epitelne celice, pri tem naj bi pomembno vlogo imele fimbrije in invazini (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005; Umeda in sod., 2006). Bakterija lahko v gostiteljevi celici preživi dolgo ter se znotraj celice tudi razmnožuje, hkrati pa je zavarovana pred imunskim odgovorom gostitelja (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005; Eick in sod., 2006). Podobno je pred imunskim odzivom gostitelja zavarovana tudi, ko se širi med celicami (Yilmaz in sod., 2006).

Izjemno pomembna za preživetje in patogenost *P. gingivalis* je njena sposobnost vplivanja na imunski odziv gostitelja. Imunski odziv lahko spremeni že takoj ob vdoru, saj zavira dotok in aktiviranje polimorfonuklearnih (PMN) levkocitov, ki so prva obrambna linija pri vdoru patogenov (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005). Tako živa kot mrtva bakterija *P. gingivalis* kot tudi številne bakterijske sestavine in produkti pospešujejo sproščanje različnih provnetnih citokinov in kemokinov (Lamont in Jenkinson, 1998; Steffen in sod., 2000; Bodet in sod., 2006), obenem pa lahko spodbujajo tudi nastajanje protivnetnih citokinov ter

povzročijo razgradnjo že obstoječih citokinov (Lamont in Jenkinson, 1998). Lipopolisaharid aktivira komplement, obenem tudi stimulira makrofage, endotelne celice in fibroblaste k tvorbi citokinov. Prav tako LPS stimulira B-celice ter je citotoksičen, a kapsula iz beljakovin in polisaharidov lahko prikrije LPS in obenem ščiti bakterijo pred fagocitozo (Lamont in Jenkinson, 1998; Wolf in sod., 2005). Lipopolisaharid *P. gingivalis* je vpleten v nastajanje interleukina 1 (IL-1), TNF- α in NO v makrofagih, čeprav je šibkejši stimulator tega odziva kot LPS *E. coli*, a izmed parodontalno patogenih bakterij stimulira največje nastajanje citokinov (Reife in sod., 1995; Wolf in sod., 2005; Liu in sod., 2008). Lipopolisaharid *P. gingivalis* lahko nasprotuje tudi provnetnim učinkom LPS drugih (parodontalno patogenih) bakterij (Lamont in Jenkinson, 1998). Toksični učinki in aktivacija imunskega sistema gostitelja so odvisni od lipida A prostega LPS (Wolf in sod., 2005; Choi in sod., 2007), vendar je LPS za gostitelja toksičen le, če je prost. Prost LPS se pojavi ob propadu celične stene ob odmrtnju bakterije, med proliferacijo bakterijskih celic ali z nastajanjem membranskih veziklov (Wolf in sod., 2005). Membranski vezikli nastajajo tudi pri sevu ATCC 33277 in lahko poleg prenosa LPS in antigenov vplivajo tudi na predstavitev antigenov na tarčnih celicah, kar je najverjetneje pomembno tudi pri izogibanju gostiteljevemu imunskemu sistemu (Grenier in Mayrand, 1987a; Srisatjaluk in sod., 2002; Wolf in sod., 2005).

Različni sevi *P. gingivalis* niso enako patogeni in tudi odziv miši ali podgan na okužbo s temi bakterijami ni vedno enak. Sev ATCC 33277 se je pri podganah izkazal kot tisti, ki povzroča največjo vertikalno in horizontalno izgubo čeljustne kosti (Katz in sod., 1996). Kljub patogenosti *P. gingivalis* pa je nadaljnji potek parodontalne bolezni tudi pri glodavcih odvisen od gostiteljevih genetskih predispozicij, imunskega odziva ter dodatnih dejavnikov tveganja (Grenier in Mayrand, 1987b; Gilbert in Sofaer, 1988; Baker in sod., 2000; Gašperšič in sod., 2002; Sluyter in sod., 2002; Baker, 2005; Wolf in sod., 2005), pri čemer naj bi bistveno vlogo pri napredovanju bolezni nosili mehanizmi pridobljene imunosti (Sosroseno in Herminajeng, 1995; Gemmell in sod., 2002; Teng, 2003), še zlasti CD4+ T-celice pri okužbi s *P. gingivalis* (Sosroseno in sod., 2002; Teng, 2003).

2.3.1 Sistemski učinki lokalne okužbe

Vedno več študij nakazuje, da okužba s parodontalno patogenimi bakterijami nima le lokalnih učinkov, pač pa se lokalna okužba lahko zrcali tudi na sistemski ravni. Vstopanje bakterij v krvni obtok, sproščanje antigenov in modulacija sistemske ravni citokinov lahko povzročijo nagnjenje organizma k okužbi in/ali vnetnemu odzivu na oddaljenih mestih. Lipopolisaharid

P. gingivalis, ki se sprošča z bakterije tudi v membranskih veziklih in lahko samostojno vpliva na izločanje citokinov, je pomemben dejavnik sistemskih učinkov lokalne okužbe (Lamont in Jenkinson, 1998; Scannapieco, 2005).

Vedno več je tudi dokazov, da parodontalna bolezen vpliva na številne sistemske bolezni tako pri človeku kot pri živalih (DeBowes in sod., 1996; Lamont in Jenkinson, 1998; Slots in Kamma, 2001; Ebersole in sod., 2002; Hajishengallis in sod., 2002; Paquette, 2002; Riche in sod., 2002; Lalla in sod., 2003; Pavlica in sod., 2004; Bretz in sod., 2005; Felice in sod., 2005; Franek in sod., 2005; Scannapieco, 2005; Engebretson in sod., 2007; Pussinen in sod., 2007). Ustna votlina je pogosto mesto vdora bakterij v organizem. Vdihovanje slin, okužene z bakterijami, se lahko pojavi pri zdravih ljudeh, zlasti pogost problem pa je pri starejših ljudeh in živalih ali bolnikih s prizadeto zavestjo, ki imajo obenem še parodontalno bolezen. To velikokrat vodi v nastanek aspiracijske pljučnice (Huxley in sod., 1978; Scannapieco, 1999; Terpenning in sod., 2001; Kikawada in sod., 2005; Okuda in sod., 2005; Paju in Scannapieco, 2007; Awano in sod., 2008). Pri tem je bilo ugotovljeno, da pljučnica, ki je posledica okužbe tako z živo kot z mrtvo bakterijo *P. gingivalis* ATCC 33277, povzroča spremembe v ravni proinflammatoryh citokinov lokalno v pljučih ter tudi v krvi (Petelin in sod., 2004; Pavlica in sod., 2008). Bakterije iz ustne votline se tudi nenehno požirajo, stalnica pri bolnikih s parodontalno boleznijo je tudi prehodna bakteriemija (Scannapieco, 2005). Nekatere po Gramu negativne bakterije se lahko iz ustne votline aktivno širijo po telesu, kar vodi v nastanek vnetnega in/ali imunskega odgovora v oddaljenih tkivih (Han in sod., 2004; Yilmaz in sod., 2006). Opisani so tudi številni drugi eksperimentalni primeri lokalne okužbe s *P. gingivalis*, ki se odražajo na sistemski ravni (Lin in sod., 2005; Hu in sod., 2006; Huang in sod., 2006)

Znano je, da parodontalna bolezen sproža sistemski oksidativni stres (Sobaniec in Sobaniec-Lotowska, 2000; Brock in sod., 2004; Pavlica in sod., 2004), podatkov o sistemskem nitroksidativnem stresu pa nismo zasledili.

2.3.2 *Porphyromonas gingivalis* in nastajanje dušikovega oksida

In vitro študije so pokazale, da LPS *P. gingivalis* lahko sproži nastajanje NO v celicah imunskega sistema kot tudi drugih celicah (Kendall in sod., 2000; Sosroseno, 2000; Shapira in sod., 2002; Kim in sod., 2006; Choi in sod., 2007). To je najverjetneje posledica vezave LPS na receptorje CD14 in TLR2 ter TLR4 gostiteljevih celic ter aktiviranja znotrajceličnega sporočanja, ki vodi v izražanje gena za iNOS in do nastajanja citokinov. Nekateri izmed teh

citokinov (kot na primer TNF- α) pa so močni aktivatorji iNOS (Krutzik in sod., 2001; Medzhitov, 2001; Jean-Baptiste, 2007; Hajishengallis in sod., 2008).

Dušikov oksid nastaja tudi v makrofagih, izoliranih iz miši, ki so bile *in vivo* kronično stimulirane s *P. gingivalis* (Frolov in sod., 1998). Podatkov o *in vivo* nastajanju NO v drugih celicah in/ali tkivih po peroralni okužbi s *P. gingivalis* pa ni. Znano je, da je NO lokalno vpleten v nastanek in razvoj parodontalne bolezni, kar je najverjetneje posledica aktivacije iNOS z LPS (Frolov in sod., 1998; Brennan in sod., 2003; Di Paola in sod., 2004; Leitao in sod., 2005; Kim in sod., 2006; Paquette in sod., 2006; Skalerič in sod., 2006; Ugar-Cankal in Ozmeric, 2006). Opisano je tudi, da se pri miših, ki gena iNOS nimajo, okužbe s *P. gingivalis* močnejše izrazijo (Gyurko in sod., 2003; Alayan in sod., 2006). Ker je torej NO z iNOS najverjetneje pomemben člen pri obrambi gostitelja ob vdoru *P. gingivalis*, vendar podatkov o sistemskem nastajanju NO v teh primerih ni, smo želeli preveriti predvsem, ali vdor *P. gingivalis* po naravni, peroralni poti izzove pri miših sistemski odziv z nastajanjem NO na iNOS.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Živali

V študijo smo vključili 65 BALB/c miši ženskega spola brez specifičnih patogenih klic (SPF), tj. bakterij, virusov in glivic, ki so bile rojene s carskim rezom, gojene pa v sterilnem okolju. Živali so bile ob vključitvi v študijo stare 2 do 3 mesece, dobili smo jih v Centru za genomiko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Miši so pred poskusom in med njim dobivale neomejene količine komercialne hrane za laboratorijske živali (Teklad Global 16% Protein Rodent Diet, Harlan Italy, San Pietro al Natisone, Italija) in prekuhano vodo z dodatkom 2-odstotne glukoze. Poskusi na živalih so se izvajali v skladu z dovoljenjem Veterinarske Uprave Republike Slovenije (Št. 323 – 02 – 187/2004/2).

3.2 Zasnova študije

3.2.1 Akutna okužba s *Porphyromonas gingivalis*

Devetindvajset miši smo razdelili v skupine, kot je predstavljeno v Tabeli 1.

Tabela 1: Skupine živali v študiji akutne okužbe s *P. gingivalis*.

Skupina	Poseg	Število živali
I	Kontrolna skupina, ki ni bila tretirana. Takojšnje žrtvovanje.	3
II	Skupina, tretirana s spinskim lovilec. Žrtvovanje 60 minut po vbrizganju spinskega lovilca.	8 (5 za NOx)*
III	Živali, okužene s tekočo kulturo <i>P. gingivalis</i> (0,1 ml 10 ⁹ CFU/ml p.o.). Spinski lovilec je vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem. Žrtvovanje po 3 živali 2,5, 7 in 13 ur po okužbi; 9 živali žrtvovanih 25 ur po okužbi.	18 (6 za NOx po 25 urah)*

*Analiza NOx je bila narejena samo na 5 oz. 6 vzorcih plazme miši zaradi težav z odvzemom krvi (hemoliza).

Ker smo pri akutni okužbi z bakterijo *E. coli* ugotovili, da 10⁸ CFU bakterij v 0,1 ml (10⁹ CFU/ml) povzroči sistemski odziv z nastajanjem NO (Nemeč in sod., 2009), smo živali p.o. okužili z 0,1 ml tekoče kulture *P. gingivalis* (10⁹ CFU/ml), pri čemer smo jim za trenutek zamašili nos, da smo izzvali vdih vsebine. V poskus nismo vključili kontrolne skupine, okužene s sterilnim gojiščem, ker smo v predhodni študiji (Nemeč in sod., 2009) ugotovili, da enkratna p.o. okužba s sterilnim gojiščem ne vpliva na sistemsko nastajanje NO.

Spinski lovilec smo določenim živalim (Tabela 1) vbrizgali 60 minut pred žrtvovanjem. Takoj nato smo odvzeli kri za določanje NOx ter pljuča, torakalno aorto, srce, jetra, vranico, ledvico in možgane za določanje NO z metodo EPR.

3.2.2 Kronična okužba s *Porphyromonas gingivalis*

Miši smo naključno razdelili v 8 ločeno nameščenih skupin, kot je prikazano v Tabeli 2. Razen skupin 1 in 2 smo miši ob vključitvi v poskus 1 teden prilagajali na nove pogoje, nato pa smo jih p.o. okužili s sterilnim gojiščem ali tekočo kulturo *P. gingivalis* (10⁹ CFU/ml). Tik pred okužbo smo odmerek (0,3 ml) sterilno zmešali z 0,2 ml karboksimetilceluloze (CMC), da smo dobili na ustnih površinah obstojnejši gel (Hardham in sod., 2005). Živali smo okužili trikrat v 48-urnih presledkih (na dan 0, 2 in 4). Pri tem smo gel nanegli v bukalno regijo s

pomočjo kanile 20G in inzulinske brizge, pri čemer smo pazili, da živali vsebine niso vdihnile.

Mišim iz skupin 4 in 7 (Tabela 2) smo i.p. vbrizgavali neselektivni NOS inhibitor L-NAME enkrat dnevno zadnjih 5 dni poskusa. Mišim iz skupin 5 in 8 pa smo i.p. vbrizgavali selektivni iNOS inhibitor 1400W, ki smo ga na podlagi rezultatov predhodne študije (Nemeč in sod., 2009) uporabljali vsakih 6 ur.

Živali smo žrtvovali 42. dan poskusa in jim iz srca takoj odvzeli kri za določanje plazemske koncentracije TNF- α in NOx. Organe smo odvzeli za določanje NO v tkivih z metodo EPR ter za imunohistokemijsko analizo na izražanje iNOS. Pred odvzemom čeljusti za histološko analizo obzobnih tkiv smo naredili bris ustne votline za ugotavljanje prisotnosti črнопigmentiranih anaerobnih bakterij.

Tabela 2: Skupine živali v študiji kronične okužbe s *P. gingivalis*.

Skupina	Poseg	Število živali
1	Kontrolna skupina, ki ni bila tretirana. Takojšnje žrtvovanje.	3 (skupina I iz akutne okužbe)
2	Skupina, tretirana s spinskim lovilcem. Žrtvovanje 60 minut po vbrizganju spinskega lovilca.	8 (skupina II iz akutne okužbe)
3	Živali, okužene s sterilnim gojiščem (0.3 ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 in 4, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	5 (1 žival smo zaradi pogina med poskusom izključili)
4	Živali, okužene s sterilnim gojiščem (0.3 ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 in 4, L-NAME je bil vbrizgan na 24 ur od dneva 37 do 42, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	5 (1 žival smo zaradi pogina med poskusom izključili)
5	Živali, okužene s sterilnim gojiščem (0.3 ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 in 4, 1400W je bil vbrizgan na 6 ur od dneva 37 do 42, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	6
6	Živali, okužene s tekočo kulturo <i>P. gingivalis</i> (0.3 ml 10 ⁹ CFU/ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 and 4, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	6
7	Živali, okužene s tekočo kulturo <i>P. gingivalis</i> (0.3 ml 10 ⁹ CFU/ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 in 4, L-NAME je bil vbrizgan na 24 ur od dneva 37 do 42, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	5 (1 žival smo zaradi pogina med poskusom izključili)
8	Živali, okužene s tekočo kulturo <i>P. gingivalis</i> (0.3 ml 10 ⁹ CFU/ml) + 0.2 ml 2-odstotnega CMC p.o. na dan 0, 2 in 4, 1400W je bil vbrizgan na 6 ur od dneva 37 do 42, spinski lovilec je bil vbrizgan 60 minut pred žrtvovanjem na dan 42.	6

3.3 Kultura *Porphyromonas gingivalis*

Kultura bakterije je bila pripravljena na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Pred pripravo gojišča je bila *P. gingivalis* zamrznjena pri -70°C v sterilnih vialah s poroznim nosilcem (Microbank; Pro-lab Diagnostics, Richmond Hill, ON, Kanada). Bakterije so bile gojene, kot je bilo že opisano (Grenier in sod., 2001; Hardham in sod., 2005). Bakterije so bile nasajene na gojišče BHIA (brain heart infusion agar; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Anglija) z dodatkom 10 mg/ml (w/v) izvlečka kvasovk, 0,15 mg/ml (w/v) hemina (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, ZDA), 0,075 ml/ml (v/v) menadiona (Sigma-Aldrich) in ovčje krvi v 5 % (v/v). Kulture so bile inkubirane vsaj 72 ur v anaerobnih pogojih (GENbox anaer; bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Material za okužbo pa je bil nato pripravljen na tekočem gojišču BHI (brain heart infusion; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Anglija) z dodatkom 10 mg/ml (w/v) izvlečka kvasovk, 0,15 mg/ml (w/v) hemina in 0,075 ml/ml (v/v) menadiona. Gostota celic je bila ocenjena na 10^9 bakterijskih celic na mililiter (10^9 CFU/ml).

3.4 Inhibitorji sintaz dušikovega oksida

V študijah smo uporabljali nespecifični inhibitor L-NAME (N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester; Sigma-Aldrich) 50 mg/kg i.p. v 0,1 ml vode za injekcije (Aqua ad iniectabilia; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Nemčija), kot predlagajo Dambrova in sodelavci (2003), ali selektivni iNOS inhibitor 1400W – ((N-(3-)aminomethyl)benzyl)acetamidine, dihydrochloride; Sigma-Aldrich), 10 mg/kg i.p. v 0,1 ml vode za injekcije (Garvey in sod., 1997; McCluskie in sod., 2004).

3.5 Spinski lovilec

Spinski lovilec smo živalim vbrizgali dveh stopnjah, kot predlagata Berliner and Fujii (2004). DETC (Diethyldithiocarbamic acid.sodium salt.trihydrate; Alexis Biochemicals, Alexis Corporation, Lausen, Švica) smo vbrizgali i.p. 500 mg/kg v 0,1 ml vode za injekcije, čemur je takoj sledilo s.c. dajanje sveže pripravljene mešanice železovega sulfata (Johnson, Matthey & Co. Limited, London, Anglija) v odmerku 100 mg/kg in natrijevega citrata (Alkaloid, Skopje, Makedonija) v odmerku 500 mg/kg v 0,1 ml vode za injekcije. Komponente spinskega lovilca se s krvjo prenesejo do tkiv, kjer nastaja $\text{Fe}(\text{DETC})_2$. Le-to reagira z NO, nastalim v tkivih, kar daje obstojen kompleks $\text{FeNO}(\text{DETC})_2$, ki je zaznaven z

metodo EPR in ima tipičen g-faktor ($g = 2,04$) (Berliner in Fujii, 2004). Spinski lovilec smo mišim vbrizgali 60 minut pred žrtvovanjem.

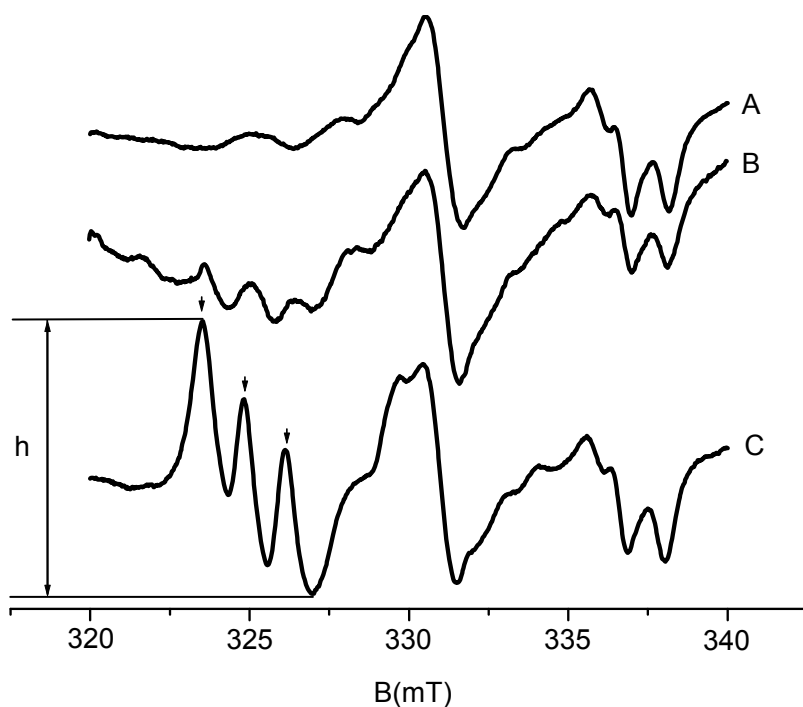
3.6 Priprava vzorcev za meritve EPR

Miši smo uspavali z i.m. uvedbo mešanice 0,5 ml ketamina (100 mg/ml, Bioketan, Vetoquinol Biowet Sp. z o.o. w Gorzowie, Poljska), 0,25 ml ksilazina (20 mg/ml, Rompun, Bayer, Leverkusen, Nemčija), 0,1 ml acepromazina (10 mg/ml, PromAce, Fort Dodge, Iowa, ZDA) in 0,15 ml vode za injekcije. Mešanica je bila pred uporabo razredčena v razmerju 1:1 z vodo za injekcije. Uporabili smo 0,5 ml mešanice, ki je v nekaj minutah privedla do splošne anestezije miši. Miši smo nato žrtvovali s cervikalno dislokacijo ter jim nemudoma iz srca odvzeli kri, takoj zatem pa smo odvzeli še pljuča, torakalno aorto, srce, jetra, vranico, ledvice in možgane, vedno v tem vrstnem redu. Odvzem vzorcev smo zaključili v 10 minutah po žrtvovanju. Vzorce organov smo natlačili v označene kvarčne cevke (notranji premer 5 mm), ki smo jih nemudoma zamrznili v tekočem dušiku. Za meritve EPR smo uporabili cele manjše organe oziroma vedno enake dele večjih organov.

3.7 Meritve EPR

Meritve EPR smo opravljali na Odseku za fiziko trdne snovi Inštituta Jožef Stefan.

Spektre EPR smo posneli na X-pasovnem spektrometru EPR znamke Bruker ESP 300 (Bruker Instruments, Inc., Billerica, MA, ZDA) z naslednjimi nastavitvami: gostota centralnega magnetnega polja 330 mT, frekvenca mikrovalov 9,3 GHz, amplituda modulacije 0,3 mT, frekvenca modulacije 100 kHz, mikrovalovna moč 13 dB, obseg snemanja 20 mT, kot je bilo že prej opisano (Berliner in Fujii, 2004) in preverjeno v naših preliminarnih poskusih. Berliner in Fujii (2004) opisujeta, da so meritve EPR pri nizkih temperaturah optimalne pri *ex vivo* poskusih, zato smo meritve opravljali pri 130 °K.



Slika 3: Značilen $\text{FeNO}(\text{DETC})_2$ spekter EPR (puščice), ki se prekriva z osnovnim spektrom jeter miši (Swartz, 1972), izmerjen pri (A) kontrolni miši, (B) kontrolni miši, tretirani s spinskim lovilcem, in (C) z 10^8 CFU *E. coli* okuženi miši, tretirani s spinskim lovilcem (meritev pri 130 °K, $g = 2.04$, h – višina signala, B – gostota magnetnega polja) (Nemeč in sod., 2009).

Jakost tripleta v spektru EPR, ki je značilen za $\text{FeNO}(\text{DETC})_2$ (Slika 3; triplet je označen s puščicami) je sorazmerna količini v tkivu ujetega NO (Suzuki in sod., 1998). Ker jakosti (dvojni integral spektra) ne moremo natančno izračunati, smo izmerili višino tripleta (na Sliki 3 označeno s h), ki je sorazmerna jakosti, če se oblika spektra ne spreminja. Ker lahko v tkivu prisotni baker tvori komplekse z DETC, ki so zaznavni z metodo EPR, smo morebitne zaznane $\text{Cu}(\text{DETC})_2$ signale odšteli od $\text{FeNO}(\text{DETC})_2$ signala kot predlagajo Suzuki in sodelavci (1998). Izmerjene višine signalov smo nato normalizirali glede na maso vzorca, relativne jakosti signalov pa označili kot AU (angl. adjusted units). Kvarčne cevke z organi, ki so med zamrzovanjem v tekočem dušiku počile, smo izločili iz študije.

3.8 Meritve plazemske koncentracije TNF-alfa in nitrata/nitrata

Kri smo po evtanaziji odvzeli iz srca v ohlajene epruvete z etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) ter jo takoj centrifugirali pri 1500 x g in 4 °C 15 minut. Plazmo smo nato takoj shranili pri -70°C do nadaljnjih preiskav. Meritve plazemske koncentracije TNF- α in

nitrita/nitrata (NO_x) je opravil naključni opazovalec na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra Ljubljana.

Plazemska koncentracija TNF- α je bila določena s pomočjo testa ELISA (Assay Designs Inc., MI, ZDA).

Plazemska koncentracija NO_x je bila izmerjena s kolorimetričnim neencimskim testom (Neogen Corporation, Lexington, KY, ZDA) po tem, ko so bili vzorci plazme deproteinizirani s cinkovim sulfatom ter je bila izvršena konverzija nitrata v nitrit s kadmijem. Nitrit se je nato določil z uporabo reagenta po Griessu (Ellis in sod., 1998; Tsikas, 2005).

3.9 Gojiščna preiskava brisov ustne votline

Pred začetkom poskusov smo na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani določili ustno mikrofloro pri poskusnih živalih. Podobno smo takoj po odvzemu organov mišim odvzeli brise ustne votline ter material nasadili neposredno na plošče BHIA (brain heart infusion agar; Oxoid Ltd.) z dodatkom 10 mg/ml (w/v) izvlečka kvasovk, 0,15 mg/ml (w/v) hemina, 0,075 ml/ml (v/v) menadiona in ovčje krvi v 5 % (v/v). Plošče so bile inkubirane vsaj 72 ur v anaerobnih pogojih in nato opazovane še vsaj 1 teden, preden smo na ploščah preverili morebitno prisotnost črnopigmentiranih anaerobnih bakterij.

3.10 Histološka ocena obzobnih tkiv

Čeljusti, ki smo jih odvzeli takoj po odvzemu brisov ustne votline, smo na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani fiksirali v 10-odstotnem nevtralnem puferiranem formalinu ter jih nato demineralizirali 3–4 dni v raztopini Osteosoft (Osteosoft, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Zgornje in spodnje čeljustnice smo ločili po demineralizaciji. Čeljusti smo vklopili v parafin ter jih rezali na 5 μ m debele rezine v bukolingvalni smeri in jih prilepili na objektna stekelca premazana, s premazom APES. Posušene smo barvali s hematoksilinom in eozinom (HE) (desna spodnja in desna zgornja čeljustnica) ali toluidinskim modrilom (TB; pH 2) (leva spodnja in leva zgornja čeljustnica). Histološko smo obzobna tkiva ocenili z mikroskopiranjem rezin HE, mastocite v dlesni pa smo šteli na rezinah TB.

Pri analizi histoloških rezin smo uporabljali mikroskop Nikon Microphot FXA (Nikon Instruments Europe B.V., Badhoevedorp, Nizozemska) in sistem Lucia-G za analizo slik (Laboratory Imaging Ltd, Praga, Češka).

3.11 Imunohistokemijsko določanje iNOS v pljučih, jetrih in ledvicah

V Centru za genomiko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za anatomijo, histologijo in embriologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani smo leve pljučne režnje, leve jetrne režnje in desne ledvice takoj po odvzemu fiksirali v Bouinovi raztopini ter jih po 24 urah premestili v 70-odstotni etanol. Organe smo nato vklopili v parafin in pripravili 5 µm debele tkivne rezine. Tkivne rezine smo deparafinizirali in jih po rehidraciji v 100-odstotnem, 96-odstotnem in 70-odstotnem etanolu sprali v TBS in jih nato 20 minut obdelovali s 3-odstotnim vodikovim peroksidom (H₂O₂) v TBS, da smo zavrli endogeno peroksidazno aktivnost. Nato smo jih ponovno sprali v TBS. Antigene smo obnovili z 20-minutno inkubacijo rezin v vrelem 0,01M natrijevem citratu (pH 6) v mikrovalovni pečici, delujoči s polno močjo (750 W), ter nato ohlajanjem na sobni temperaturi 20 minut, preden smo jih ponovno sprali v TBS. Nespecifična mesta smo 60 minut blokirali z normalnim kozjim serumom (Millipore, Billerica, MA, ZDA) v TBS (1:5 razredčina) pri sobni temperaturi, preden smo tkivne rezine inkubirali s specifičnimi primarnimi protitelesi (proti-iNOS zajčja poliklonalna protitelesa, Anti-iNOS/NOSII, NT, Millipore, 1:100 razredčina) ali normalnim kozjim serumom (kontrolne tkivne rezine) pri 4 °C čez noč. Po spiranju rezin v TBS smo le-te 30 minut inkubirali s sekundarnimi protitelesi (kozja protizajčja protitelesa, Jackson immunoresearch, West Grove, PA, ZDA, 1:100 razredčina s TBS) pri sobni temperaturi, jih nato dvakrat sprali v TBS ter inkubirali 30 minut s kompleksom peroksidaza-antiperoksidaza (PAP, Jackson immunoresearch) pri sobni temperaturi. Rezine smo dvakrat sprali v TBS preden smo specifično vezavo določali z razvijanjem barve z diaminobenzidin-tetrahidrokloridom (DAB, Sigma-Aldrich) v prisotnosti 0,01-odstotnega H₂O₂ do 20 minut, odvisno od organa. Rezine smo nato obarvali s hematoksilinom, dehidrirali v 70-odstotnem, 96-odstotnem in nato v 100-odstotnem etanolu, razbistrili v ksilenu ter jih vklopili v Pertex medij (Medite, Burgdorf, Germany) pred mikroskopskim pregledom histoloških rezin z mikroskopom Nikon Microphot FXA (Nikon Instruments Europe B.V.). Reprezentativne rezine smo posneli s sistemom Lucia-G za analizo slik (Laboratory Imaging Ltd.).

3.12 Statistična analiza

Statistična obdelava podatkov je bila narejena na Kliničnem oddelku za pljučne bolezni in alergijo Bolnišnice Golnik.

Normalnost porazdelitve rezultatov smo testirali z univariatno analizo za NO in NO_x vrednosti ter vrednosti števila mastocitov v dlesni. Ker niti porazdelitev spremenljivk niti

njena log-transformacija nista bili normalni, so rezultati predstavljeni kot mediane vrednosti z minimalnimi in maksimalnimi odstopanji.

Za testiranje razlik med skupinami (vzorci so bili neodvisni) smo uporabili neparametrični Wilcoxonov enosmerni test dveh vzorcev.

Korelacijo med vrednostmi NO v organih in NO_x v plazmi smo testirali s Spearmanovim korelacijskim testom na osnovi rangov.

Za testiranje razlik v iNOS imunoreaktivnosti, ki je bila opisana kot pozitivna ali negativna, v različnih področjih ledvic miši iz različnih skupin, smo uporabili Fisherjev natančni test.

Rezultate smo opredelili kot statistično značilne pri $p < 0,05$. Statistično obdelavo podatkov smo opravili na osebem računalniku s programskim paketom za statistično obdelavo podatkov SAS 9.00 (SAS Institute Inc., Cary, NC, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 Akutna okužba s *Porphyromonas gingivalis*

4.1.1 Plazemska koncentracija nitrita/nitrata

Nitrit/nitrat smo izmerili v vseh vzorcih plazme miši iz kontrolne skupine, ki ni bila tretirana (skupina I) (mediana vrednost 17.6 $\mu\text{mol/l}$, minimalna vrednost 13.4 $\mu\text{mol/l}$, maksimalna vrednost 19.2 $\mu\text{mol/l}$) in miši, ki pa so bile tretirane s spinskim lovilcem (skupina II) (med. 16.8 $\mu\text{mol/l}$, min. 16.4 $\mu\text{mol/l}$, maks. 20.8 $\mu\text{mol/l}$). Med skupinama I in II ni bilo statistično značilnih razlik.

Plazemska koncentracija NO_x je bila znižana v vseh časovnih intervalih pri s *P. gingivalis* okuženih živalih (skupina III), pri čemer je bila statistično značilno znižana ($p = 0.017$) 7, 13 in 25 ur po okužbi v primerjavi z mišmi iz skupine II (graf 1a). Najnižja vrednost plazemske koncentracije NO_x je bila izmerjena 7 ur po okužbi s *P. gingivalis* (med. 10.8 $\mu\text{mol/l}$, min. 7.2 $\mu\text{mol/l}$, maks. 13.6 $\mu\text{mol/l}$). Vrednosti plazemske koncentracije NO_x pri posameznih živalih so predstavljene v Tabeli 3 v prilogi.

4.1.2 Spektri EPR organov miši iz kontrolnih skupin

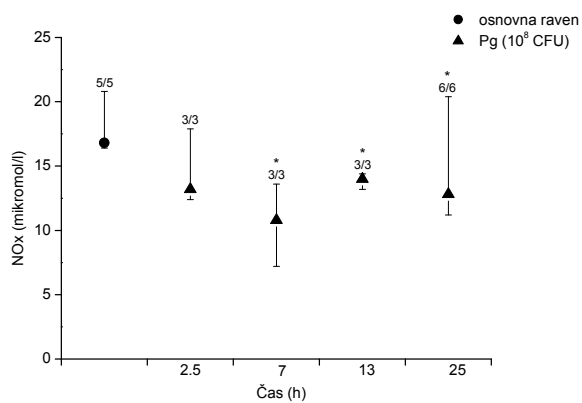
Osnovni spektri organov miši iz kontrolne skupine I so se glede na vrsto organa razlikovali, kot je že bilo opisano (Swartz, 1972). Pri miših, tretiranih s spinskim lovilcem (skupina II), se je signal FeNO(DETC)₂ pojavljal v organih nekaterih živali, kot je prikazano na Sliki 3 za jetra miši. Signal FeNO(DETC)₂ smo zaznali v pljučih vseh miši iz skupine II (med. 4.45 AU, min. 1.56 AU, maks. 10.21 AU), v ostalih organih kontrolnih miši pa se signal ni pojavljal vedno (Graf 1b do 1h).

4.1.3 Spektri EPR organov miši, okuženih s *Porphyromonas gingivalis*

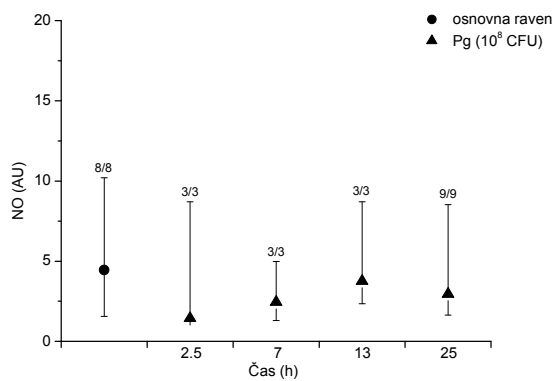
Število živali, pri katerih smo zaznali signal FeNO(DETC)₂, ter izmerili jakost signala, je predstavljeno v grafih 1b do 1h. Signal FeNO(DETC)₂ smo vedno zaznali v pljučih in jetrih okuženih živali v vseh časovnih intervalih. Odstotek živali, pri katerih smo signal zaznali, je bil večji v daljšem času po okužbi. Razen rezultatov iz možganov in aorte 13 ur po okužbi, so mediane vrednosti vsebnosti NO v organih nižje pri miših, okuženih s *P. gingivalis*, (skupina III) v primerjavi z neokuženimi živalmi iz skupine II, vendar razlike niso statistično značilne.

Vrednosti normiranih rezultatov meritev višine signala FeNO(DETC)₂ v posameznih organih pri posameznih živalih so predstavljene v Tabeli 3 v prilogi.

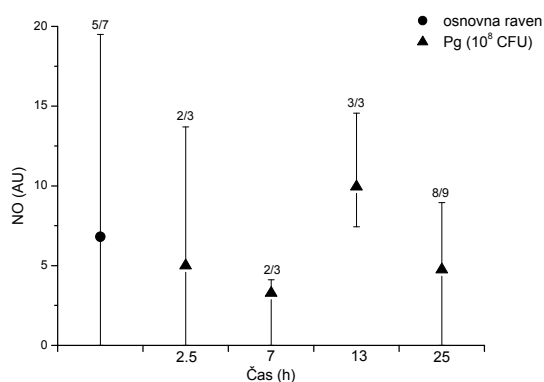
Graf 1a) NOx v plazmi



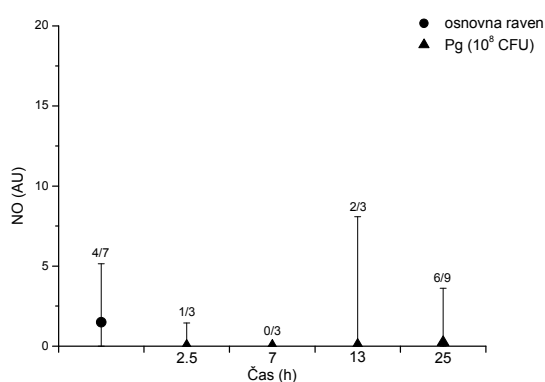
Graf 1b) NO v pljučih



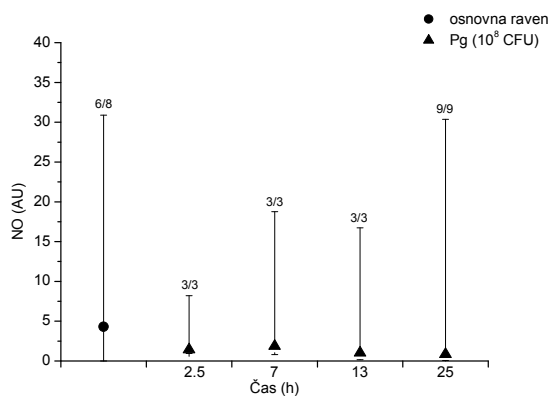
Graf 1c) NO v aorti



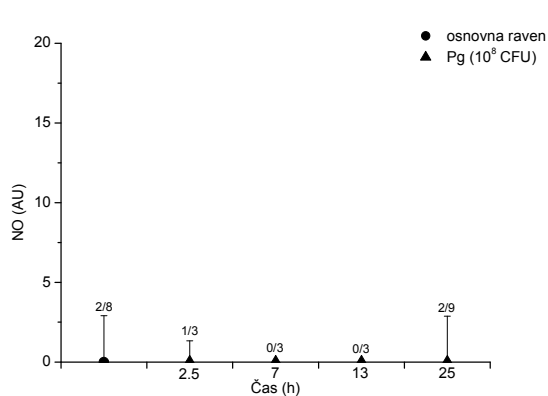
Graf 1d) NO v srcu



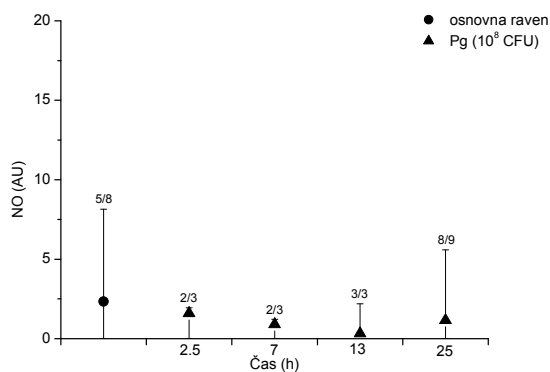
Graf 1e) NO v jetrih



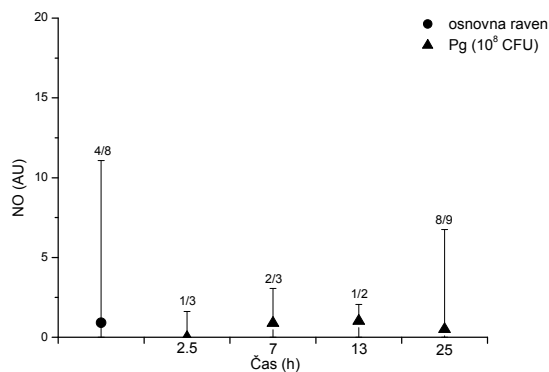
Graf 1f) NO v vranici



Graf 1g) NO v ledvicah



Graf 1h) NO v možganih



Graf 1: S časom povezano nastajanje NO_x v plazmi (1a) in NO v različnih organih (1b do 1h) okuženih miši. *Statistično značilna razlika med neokuženimi (skupina II) in okuženimi (skupina III) mišmi. Krogi in trikotniki prikazujejo mediane vrednosti NO_x ali NO, minimalna in maksimalna odstopanja pa so prikazana z daljicami. Število miši, pri katerih smo NO_x izmerili v plazmi ali NO v organih, ter število vseh testiranih vzorcev je prikazano kot a/b nad daljico maksimalnega odstopanja. Število testiranih vzorcev zaradi izključitve poškodovanih vzorcev ne ustreza vedno številu živali v določeni skupini.

Korelacija med NO_x v plazmi in NO v organih je bila statistično značilno pozitivna za jetra (Spearmanov korelacijski koeficient = 0,81; p = 0,0025) in mejno pozitivna za ledvice (0,58; p = 0,059).

4.2 Kronična okužba s *Porphyromonas gingivalis*

4.2.1 Brisi ustne votline

Pri neokuženih miših, vključenih v študijo, smo iz ustne votline izolirali α -hemolitične streptokoke, *Flavobacterium odoratum*, *Pasteurella sp.* ter različne koagulazno negativne stafilokoke.

Z gojiščno preiskavo nismo zabeležili prisotnosti črnopigmentiranih anaerobnih bakterij pri nobeni od poskusnih živali 42. dan poskusa.

4.2.2 Histološka ocena obzobnih tkiv

V subepitelnem žilnem pletežu dlesni smo opazili v vseh vzorcih prisotnost polimorfonuklearnih (PMN) celic, vendar v nobenem primeru nismo zaznali subepitelnih okrogloceličnih infiltratov. Pripojni epitel je bil v vseh vzorcih normalen in v nobenem primeru nismo opazili izgube epitelnega prirastišča. Zato smo vse vzorce opisali kot klinično zdrave dlesni (Wolf in sod., 2005) (Slika 4). Nobenih razlik ni bilo v pojavnosti mastocitov v vezivnem tkivu dlesni pri živalih iz različnih skupin.

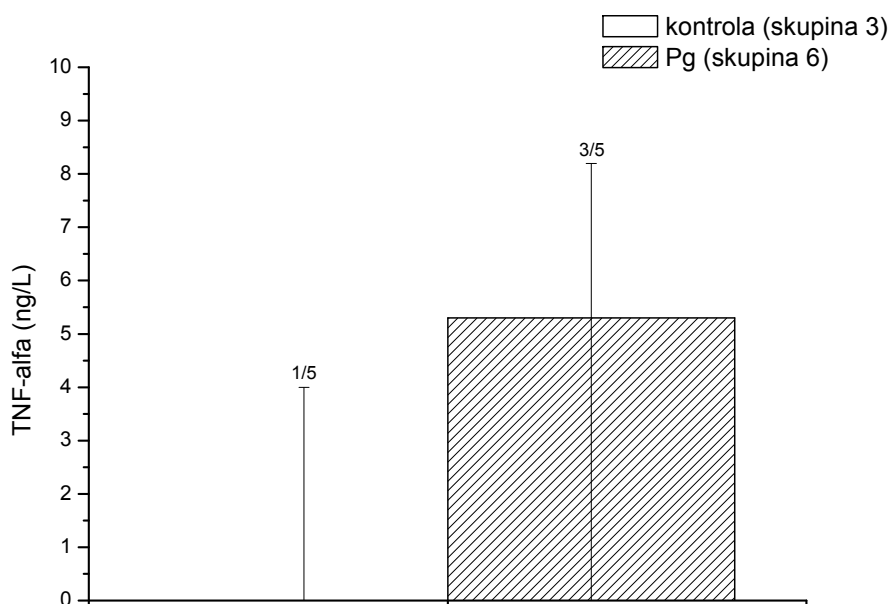


Slika 4: Obzobna tkiva pri okuženi živali iz 6. skupine. V subepitelnem žilnem pletežu so polimorfonuklearni levkociti (➡). Izgube epitelnega prirastišča ni (↓ označuje cementno-skleninsko mejo). K–čeljustna kost, D–dentin, P–zobna pulpa. Hematoksilin in eozin, 20-kratna povečava.

4.2.3 Plazemska koncentracija TNF-alfa in nitrita/nitrata

Plazemska koncentracija TNF- α je bila zvečana pri miših, okuženih s *P. gingivalis* (6. skupina), v primerjavi s kontrolnimi živalmi iz 3. skupine, vendar rezultati niso bili statistično značilni ($p = 0,079$) (Graf 2).

Vrednosti plazemske koncentracije TNF- α pri posameznih živalih so predstavljene v Tabeli 4 v prilogi.



Graf 2: Plazemska koncentracija TNF- α . Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev plazme, v katerih smo zaznali TNF- α ter število testiranih vzorcev.

V vseh vzorcih netretiranih in s spinskim lovilcem tretiranih kontrolnih miši je bila zaznavna koncentracija NO $_x$ (Tabela 4, priloga), med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik.

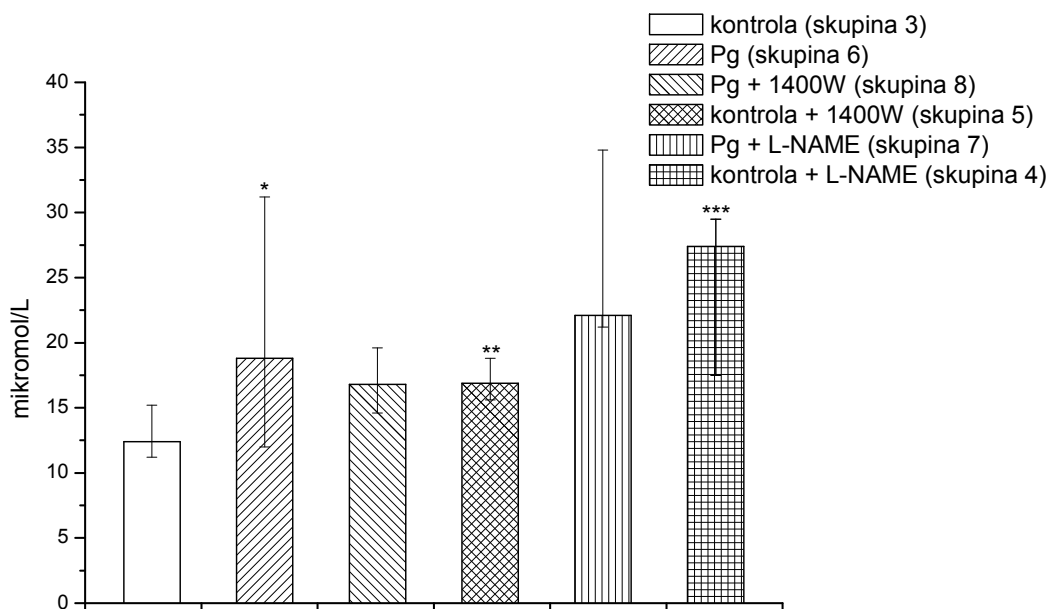
Ko smo rezultate plazemske koncentracije NO $_x$ pri kontrolni skupini (3. skupina) miši primerjali z rezultati s *P. gingivalis* okuženih miši iz 6. skupine, smo ugotovili statistično značilno ($p = 0,028$) zvečanje plazemske koncentracije NO $_x$ pri okuženih živalih (Graf 3).

V primerjavi z okuženimi živalmi (6. skupina) je bila pri okuženih miših, tretiranih s 1400W (8. skupina), plazemska koncentracija NO $_x$ zmanjšana, čeprav statistično neznačilno, in tudi ni dosegla osnovne koncentracije NO $_x$ pri kontrolnih živalih iz 3. skupine. Nasprotno pa se je pri neokuženih živalih, tretiranih s 1400W (5. skupina), plazemska koncentracija NO $_x$

statistično značilno ($p = 0,004$) zvečala v primerjavi s kontrolnimi živalmi iz 3. skupine (Graf 3).

Pri okuženih živalih, tretiranih z L-NAME (7. skupina), smo izmerili zvečano koncentracijo NOx v plazmi v primerjavi z okuženimi netretiranimi živalmi (6. skupina). Podobno je bila plazemska koncentracija NOx zvečana pri neokuženih živalih, tretiranih z L-NAME (4. skupina), v primerjavi s kontrolnimi živalmi iz 3. skupine. Slednji rezultati so bili statistično značilni ($p = 0,006$).

Vrednosti plazemske koncentracije NOx pri posameznih živalih iz različnih skupin so predstavljene v Tabeli 4 v prilogi.



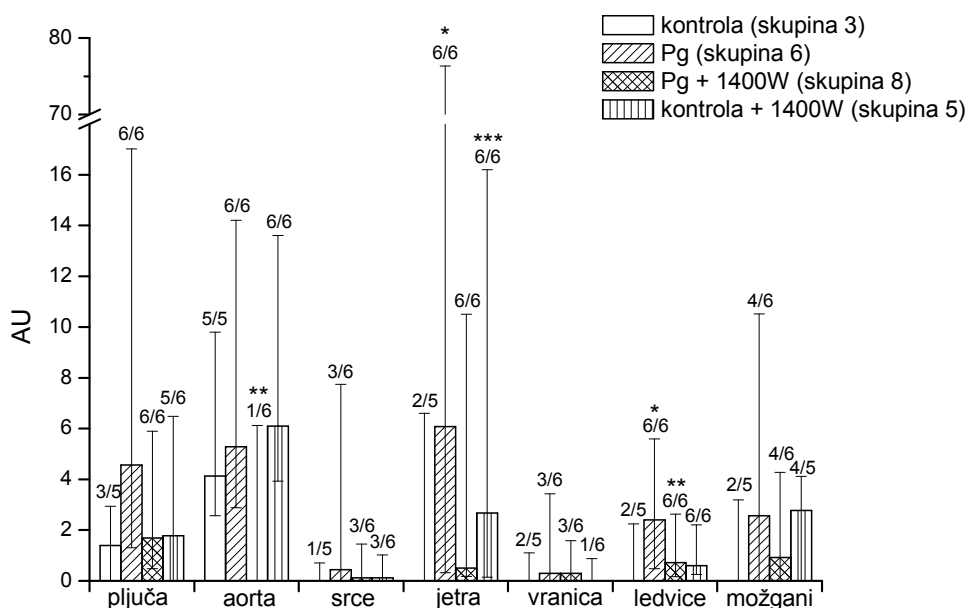
Graf 3: Plazemska koncentracija NOx. *Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in skupino s *P. gingivalis* okuženih živali (6. skupina). **Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in kontrolno skupino živali, tretirano s 1400W (5. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolno skupino živali (3. skupina) in kontrolno skupino živali, tretirano z L-NAME (4. skupina). Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev plazme, v katerih smo zaznali NOx ter število testiranih vzorcev.

4.2.4 Spektri EPR organov

Pri vseh kontrolnih živalih iz 3. skupine smo v različnih organih, vendar ne vedno, izmerili prisotnost NO. Signal pa je bil v različnih organih v povprečju višji in se je pojavljal pri večjem številu tistih živali, ki so bile okužene s *P. gingivalis* (6. skupina). Pri tem je bila v 6. skupini izmerjena statistično značilno višja vsebnost NO v jetrih ($p = 0,017$) in ledvicah ($p = 0,027$) v primerjavi z živalmi iz 3. skupine (Graf 4).

Pri okuženih živalih, tretiranih s 1400W (8. skupina), je bila v vseh organih, razen v vranici, izmerjena manjša vsebnost NO kot pri okuženih živalih (6. skupina). Pri tem je bila statistično značilna razlika v vsebnosti NO med skupinama izmerjena v aorti ($p = 0,008$) in ledvicah ($p = 0,046$), vendar je bila zgolj v aorti vsebnost NO nižja kot pri kontrolni skupini (3. skupina, osnovna raven NO v organih) (Graf 4).

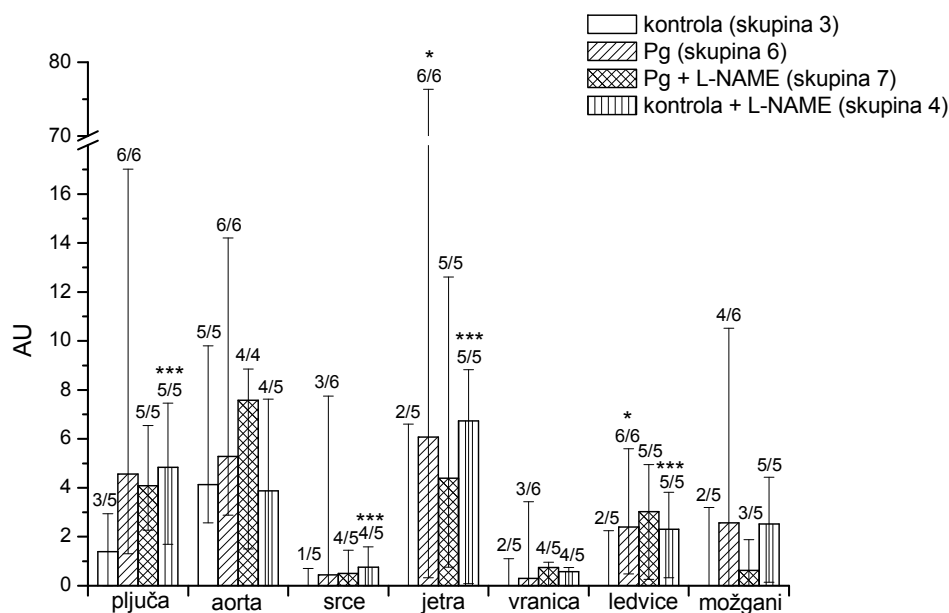
Pri neokuženih živalih, tretiranih s 1400W (5. skupina), smo, razen v vranici, izmerili višjo vsebnost NO v organih v primerjavi s kontrolnimi živalmi (3. skupina), statistično značilna razlika je bila dokazana v jetrih ($p = 0,04$) (Graf 4).



Graf 4: Relativna vsebnost NO v organih kontrolnih in s *P. gingivalis* okuženih miši. Vpliv iNOS selektivnega inhibitorja 1400W. *Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in s *P. gingivalis* okuženimi živalmi (6. skupina). **Statistično značilna razlika med s *P. gingivalis* okuženimi živalmi (6. skupina) in s *P. gingivalis* okuženimi živalmi, tretiranimi s 1400W (8. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in kontrolnimi živalmi, tretiranimi s 1400W (5. skupina). Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev organov, v katerih smo zaznali NO, ter število testiranih vzorcev.

Pri okuženih živalih, tretiranih z L-NAME (7. skupina), je bila v pljučih, jetrih in možganih izmerjena manjša vsebnost NO kot pri okuženih živalih (6. skupina), medtem ko je bila v ostalih organih vsebnost NO večja, vendar razlike niso bile nikoli statistično značilne (Graf 5).

Pri neokuženih živalih, tretiranih z L-NAME (4. skupina), smo, razen v aorti, izmerili višjo vsebnost NO v organih v primerjavi s kontrolnimi živalmi (3. skupina), statistično značilna razlika pa je bila dokazana v pljučih ($p = 0,018$), srcu ($p = 0,037$), jetrih ($p = 0,029$) in ledvicah ($p = 0,029$) (Graf 5).



Graf 5: Relativna vsebnost NO v organih kontrolnih in s *P. gingivalis* okuženih miši. Vpliv neselektivnega NOS inhibitorja L-NAME. *Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in s *P. gingivalis* okuženimi živalmi (6. skupina). **Statistično značilna razlika med s *P. gingivalis* okuženimi živalmi (6. skupina) in s *P. gingivalis* okuženimi živalmi, tretiranimi z L-NAME (7. skupina). ***Statistično značilna razlika med kontrolnimi živalmi (3. skupina) in kontrolnimi živalmi, tretiranimi z L-NAME (4. skupina). Višina stolpcev označuje mediano vrednost, daljice pa odstopanja. Številke nad daljicami pokažejo število vzorcev organov, v katerih smo zaznali NO, ter število testiranih vzorcev.

Vrednosti normiranih rezultatov meritev višine signala FeNO(DETC)₂ v posameznih organih pri posameznih živalih iz različnih skupin so predstavljene v Tabeli 4 v prilogi.

Korelacija med NO_x v plazmi in NO v organih je bila statistično značilno pozitivna za pljuča (Spearmanov korelacijski koeficient = 0,35; p = 0,032) in ledvice (0,47; p = 0,003), mejno statistično značilna pa za srce (0,30; p = 0,069) in jetra (0,30; p = 0,069).

4.2.5 Imunohistokemijsko določanje iNOS v pljučih, jetrih in ledvicah

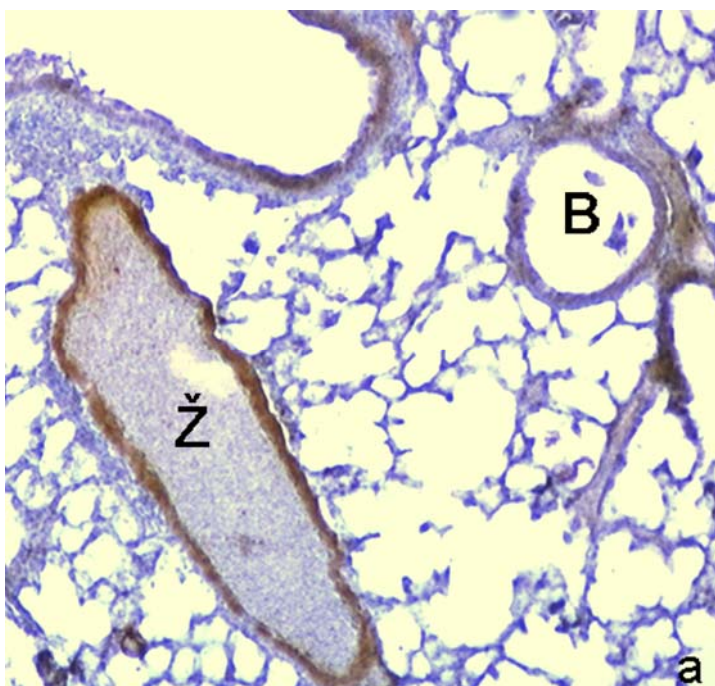
Z imunohistokemijsko analizo nismo zasledili razlik v prisotnosti iNOS v pljučih, jetrih in ledvicah miši iz različnih poskusnih skupin.

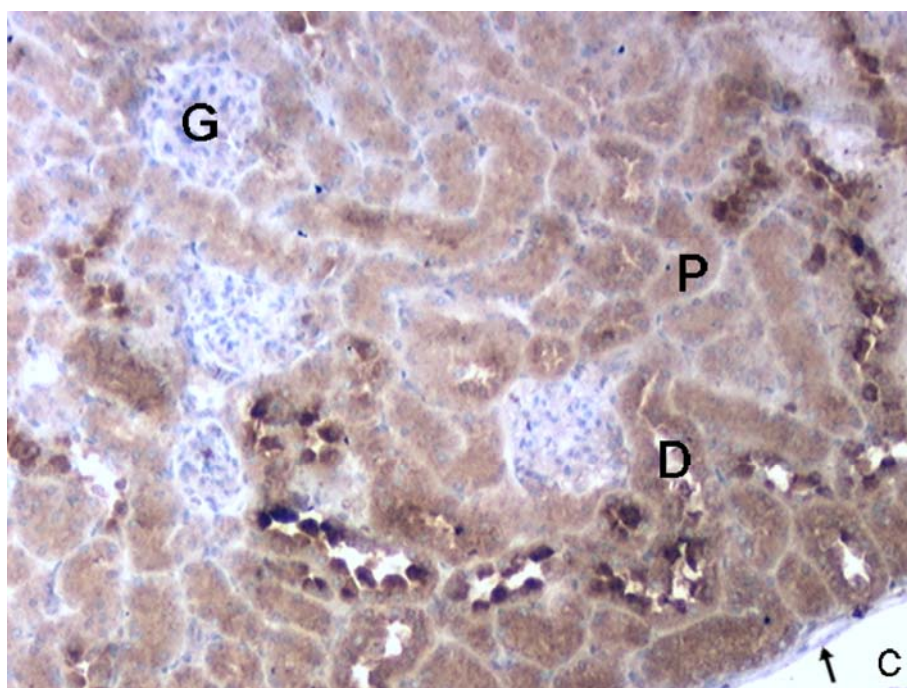
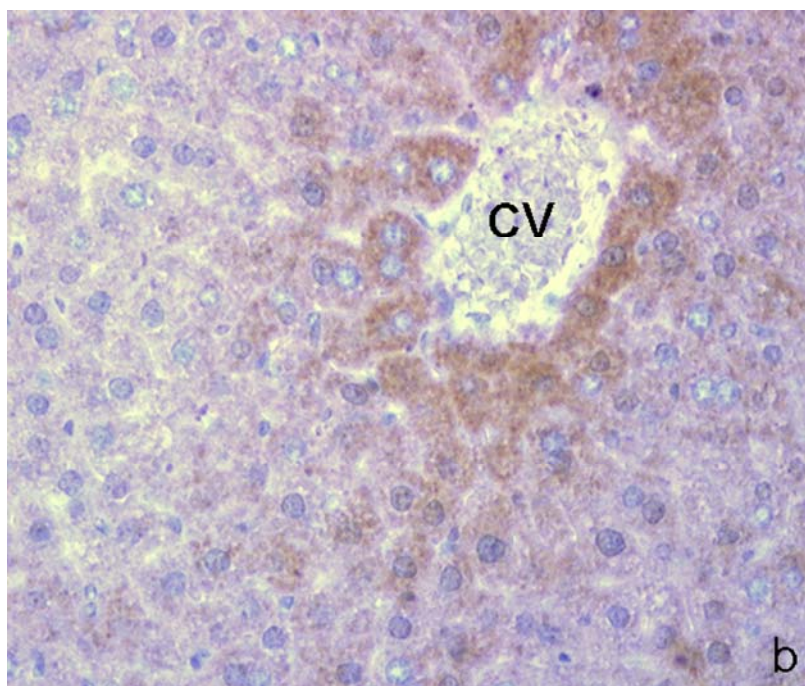
V pljučnem parenhimu vseh miši iz kontrolne skupine (3. skupina) in skupine, okužene s *P. gingivalis* (6. skupina), smo opazili posamezne skupke okroglih celic, v katerih pa nismo

zaznali prisotnosti iNOS. Očitna pa je bila prisotnost iNOS v mišični plasti večjih žil v vseh vzorcih pljuč (Slika 5a).

V jetrnih celicah v vseh vzorcih smo imunohistokemijsko dokazali prisotnost iNOS, obarvanje je bilo ponavadi bolj izrazito okrog centralnih ven (Slika 5b) in na obrobju režnjev.

V večini vzorcev ledvic smo imunohistokemijsko potrdili prisotnost iNOS, vendar med skupinami ni bilo razlik v pojavnosti pozitivnih vzorcev. Celice, v katerih se je iNOS pojavljala, smo zasledili v zunanem delu skorje ledvic (Slika 5c), zunanjem delu sredice in v do 50 % primerov tudi v ledvični papili (Tabela 4, priloga).





Slika 5: Imunohistokemijsko določanje iNOS (celice pozitivne na iNOS so obarvane intenzivno rjavo, jedra celic so obarvana s hematoksilinom). a–mikrofotografija pljuč, pozitivna imunohistokemijska reakcija na iNOS v mišični plasti večjih žil (Ž). B–svetlina bronha, 40-kratna povečava. b–mikrofotografija jeter, izrazitejše obarvanje celic okrog centralnih ven (CV), 200-kratna povečava. c–mikrofotografija ledvične skorje, celice pozitivne na iNOS v distalnih tubulih (G–glomerul, P–proximalni tubul, D–distalni tubul, ↓ označuje ledvično kapsulo).

5 DISKUSIJA

5.1 Sistemska raven dušikovega oksida v akutni fazi po peroralni okužbi s *Porphyromonas gingivalis*

V predhodni študiji (Nemec in sod., 2009) smo ugotovili, da enkratna peroralna okužba z bakterijo *E. coli* ATCC 25922, ki lahko povzroča pri miših različne okužbe (Hof in sod., 1986; Sobrinho in sod., 1998; Ko in sod., 2005; Hwang in sod., 2007), izzove povečano nastajanje NO v različnih organih, vendar je v primerjavi s septičnim šokom časovni potek nastajanja NO po peroralni okužbi drugačen. Podobno velja, da je odziv na enak odmerek endotoksina po času in kvalitativno različen, če se endotoksin vnese sistemsko (i.v.) ali lokalno v pljuča (O'Grady in sod., 2001). Pri peroralnem vnosu *E. coli* se odziv pojavi bolj zgodaj in je dvofazen v primerjavi s septičnim šokom. Ugotovili smo tudi, da so pri peroralni okužbi v nastajanje NO vpleteni drugi organi kot pri septičnem šoku. Možno je torej, da so živali in ljudje razvili hitrejši sistemski imunski odziv na bakterije, ki vstopajo v telo po naravni, peroralni poti. Slednje je podprto z ugotovitvijo, da polimorfonuklearni (PMN) levkociti, izolirani iz ustne votline zdravih ljudi, tvorijo bistveno večje količine reaktivnih kisikovih zvrsti kot polimorfonuklearni (PMN) levkociti, izolirani iz periferne krvi, ko so stimulirani (Sato in sod., 1996). Podobno velja pri miših za alveolne makrofage, saj so le-ti učinkovitejši pri odstranjevanju *P. gingivalis* v primerjavi s peritonealnimi makrofagi ali makrofagi v vranici, pri čemer je bistvenega pomena nastajanje mikrobicidnega NO (Hajishengallis in sod., 2008).

Cilj študije je torej bil ponazoriti naravno okužbo gostitelja s *P. gingivalis*. Pri tem smo peroralno okuževali zavestne živali, ker smo se želeli izogniti uporabi anestetikov, nujnih pri intratrahealni ali intranazalni okužbi (Petelin in sod., 2004; Marks in sod., 2007), saj je znano, da anestetiki znižujejo raven provnetnih citokinov pri eksperimentalno povzročeni endotoksemiji (Hofstetter in sod., 2005; Taniguchi in Yamamoto, 2005). Že prej smo ugotovili, da ob takšnem načinu okužbe živali pride do požiranja, deloma pa tudi do vdihovanja okuženega materiala (Nemec in sod., 2009). Zato lahko pričakujemo, da do primarnega odziva gostitelja na antigene pride na različnih mestih – v orofaringealnem limfatičnem tkivu, prebavilih in/ali pljučih, čemur najverjetneje sledi sistemski odziv.

Čeprav je gastrointestinalna okužba s *P. gingivalis* ATCC 33277 manj verjetna, saj je bakterija občutljiva na kislino (Takahashi in Schachtele, 1990), pa je možen nastanek endotoksemije. Znano namreč je, da LPS po peroralnem vnosu lahko prehaja črevesno

sluznico in vpliva na poslabšanje vnetja v oddaljenih tkivih (Yoshino in sod., 1999). Tudi v primeru, da je odziv gostitelja posledica vdihavanja antigenov, je možno, da bi zaznali zvečano sistemsko nastajanje NO, saj je znano, da lokalno nastajanje NO pri intersticijski pljučnici vodi v zvečanje koncentracije NOx v serumu (Miyakawa in sod., 2002).

Da bi ocenili sistemsko nastajanje dušikovega oksida, smo pri živalih merili plazemsko koncentracijo nitrita/nitrata (NOx), saj je to stabilen končni produkt metabolizma NO, ki ga lahko zaznamo v krvi in urinu (Tsikas, 2005).

Plazemski NOx smo zaznali tako pri kontrolnih miših kot pri kontrolnih s spinskim lovilec tretiranih miših, ki najverjetneje izvira iz hrane (Green in sod., 1981; Ellis in sod., 1998). Ker med skupinama nismo opazili razlik, smo vpliv spinskega lovilca na nastajanje NOx zanemarili.

Pri okuženih živalih smo v primerjavi s kontrolnimi živalmi zaznali očitno padec plazemske koncentracije NOx, ki je dosegel najnižje vrednosti in statistično značilno znižanje 7 ur po okužbi. V zgodnejši fazi (2,5 ure) po okužbi to znižanje najverjetneje ni bilo tako očitno, ker je razpolovna doba nitrata v plazmi miši 1,54 ure (Veszelsky in sod., 1995). Veszelsky in sodelavci (1995) ter Hayashi in sodelavci (2005) menijo, da serijsko spremljanje plazemske koncentracije NOx omogoča vrednotenje aktivnosti iNOS *in vivo*. Ob tem pa se je potrebno zavedati, da lahko NO v bioloških sistemih nastaja tudi neencimsko (Berliner in Fujii, 2004).

Da bi določili nastajanje NO v organih miši in koliko prispeva k nastajanju plazemskega NOx, smo pri kontrolnih in okuženih živalih izmerili jakost tripletnih signalov EPR, značilnih za FeNO(DETC)₂, kot je prikazano na Sliki 3, in tako določili vsebnost NO v organih (Venkataraman in sod., 2002; Kleschyov in sod., 2003). Izmerjeni NO najverjetneje zrcali vsebnost NO v celicah organov, saj je spinski lovilec Fe(DETC)₂ zaradi svoje hidrofobnosti najučinkovitejši za lovljenje v membranah ujetega NO (Kleschyov in Munzel, 2002). Skoraj neverjetno je, da bi izmerjeni NO predstavljal NO v krvi, saj je znano, da so za sistemsko nastajanje NO pri septičnem šoku pri miših odgovorne celice parenhimskih organov in ne hematopoetske celice (Bultinck in sod., 2006). Poleg tega pa bi bil signal EPR, ki bi ga dobili iz NO v krvi, drugačen, saj se NO v krvi veže na hemoglobin in ne na hidrofobni spinski lovilec (Kalyanaraman, 1996; Takizawa in sod., 2002).

Dušikov oksid smo zaznali tako v organih neokuženih kot okuženih živali. Pri neokuženih živalih najverjetneje zaznavamo NO, ki nastaja na konstitutivnih izooblikah NOS, kar opisujejo tudi drugi avtorji (Kleschyov in Munzel, 2002; Hayashi in sod., 2005; Thippeswamy in sod., 2006). Berliner in Fujii (2004) pa omenjata, da je količina NO, ki izvira iz konstitutivnih izooblik NOS, ponavadi prenizka (pikomolarne koncentracije), da bi jo

zaznali z metodo EPR. Možno je torej, da pri neokuženih živalih zaznavamo NO, ki nastaja zaradi neodkritega vnetnega žarišča ali pa je posledica neencimskega nastajanja.

Kljub temu pa smo pri okuženih živalih zaznali upadanje količine NO v vseh organih, razen v možganih in aorti 13 ur po okužbi. To je v skladu s trendom NO_x v plazmi, čeprav je bila korelacija med NO_x v plazmi in nastalim NO v organih statistično značilna samo za jetra.

Iz tega lahko sklepamo, da enkratna peroralna okužba s *P. gingivalis* znižuje sistemsko nastajanje NO v akutni fazi imunskega odziva. Znižana sistemsko raven NO je lahko posledica povečane porabe ali povečane razgradnje NO ali pa zmanjšanja nastajanja NO na NOS, saj se bioaktivnost NO uravnava tako z nastajanjem na NOS kot z razgradnjo (Liu in sod., 2004).

Opisano je, da izražanje iNOS po izpostavitvi organizma endotoksinom sovpada s povečanjem S-nitrozilacije tarčnih celičnih proteinov (Liu in sod., 2004; Gao in sod., 2005), kar bi lahko v našem primeru privedlo do povečane porabe NO in s tem do zmanjšanja prostega NO, ki ga lahko ujamemo s spinskim lovilec. Najverjetneje pa so v opisane procese vpletene še druge metabolne poti NO (Liu in sod., 2004; Lancaster, 2006).

Obenem je tudi znano, da lahko LPS nekaterih bakterij sproža nastajanje in izločanje s trigliceridi bogatih lipoproteinov. Ti lahko vežejo LPS, da nastanejo kompleksi lipoprotein-LPS, ki lahko zavirajo nastajanje NO v jetrnih celicah podgan zaradi zmanjšane odziva teh celic na pro-vnetne citokine (Kumwenda in sod., 2002; Harris in Kasravi, 2003). Opisani učinek je bil zaznan že 2 uri po začetku poskusa, največji zaviralni učinek na nastajanje NO je bil opisan po 6 urah, po 40 urah pa je bil odziv jetrnih celic na pro-vnetne citokine enak pri okuženi in neokuženi skupini živali (Harris in Kasravi, 2003). Podoben časovni potek zmanjšanja nastajanja NO tako v jetrih kot ostalih organih smo opazili tudi v naši študiji. Opisana toleranca na citokine je najverjetneje mehanizem po Gramu negativnih bakterij, ki s pomočjo lipoproteinov, bogatih s trigliceridi, zavrejo prirojeni imunski odziv gostitelja (Harris in Kasravi, 2003). Pojav je neodvisen od endotoksične aktivnosti LPS (Kasravi in sod., 2005).

Prav tako je znano, da *P. gingivalis* lahko sproža nastajanje protivnetnih citokinov, razgradi obstoječe citokine in nasprotuje učinkom interleukina 8 (IL-8), ki nastaja v epitelnih celicah, kar privede do zavora prirojenih imunskih odzivov gostitelja (Lamont in Jenkinson, 1998). Po enkratni intratrahealni okužbi s sonicirano bakterijo *P. gingivalis* ATCC 33277 je bilo ugotovljeno, da je 2 uri po okužbi razmerje topnih receptorjev za TNF- α (sTNFR2/sTNFR1) v serumu zvečano, kar lahko nasprotuje učinkom TNF- α v akutni fazi imunskega odziva (Petelin in sod., 2004). Obenem je pri septičnem šoku opisano, da je raven topnih receptorjev

za TNF- α v serumu povezana s serumsko koncentracijo nitrata, pri čemer avtorji domnevajo, da lahko protivnetni citokini zavirajo nastajanje NO (Groeneveld in sod., 1997).

Ker je na iNOS nastali NO pomemben v imunskem odzivu pri okužbah s *P. gingivalis* (Gyurko in sod., 2003; Alayan in sod., 2006), igra v naši študiji opaženo zmanjšanje sistemske ravni NO najverjetneje pomembno vlogo pri akutnem odzivu na peroralno okužbo s *P. gingivalis*. Znano je namreč, da lahko v zgodnjih fazah okužbe *P. gingivalis* zavira imunski odziv gostitelja, kar olajša bakterijsko kolonizacijo tudi zaradi zavora vstopa polimorfonuklearnih (PMN) levkocitov v tkivo (Lamont in Jenkinson, 1998). Vedno več je dokazov, da je LPS bistvenega pomena pri začetnem zaviranju imunskega odziva gostitelja, saj je šibek aktivator nastajanja interleukina 1-beta (IL-1 β) in TNF- α v monocitih (Reife in sod., 1995; Lamont in Jenkinson, 1998), ti pa so pomembni za aktiviranje iNOS (Jean-Baptiste, 2007). Mehanizmi interakcije *P. gingivalis* LPS z receptorji CD14 so torej najverjetneje vpleteni v zmanjšanje obrambne sposobnosti gostitelja, ki se zrcali v toleranci gostitelja na bakterijo (Lamont in Jenkinson, 1998).

Ne le, da je v primerjavi z LPS *E. coli* LPS *P. gingivalis* biološko manj reaktiven (Reife in sod., 1995), kaže se tudi, da LPS obeh bakterij aktivirata različne tipe imunosti *in vivo* (Pulendran in sod., 2001), kar ugotavljamo tudi v naših študijah (Nemeč in sod., 2009).

Večji odstotek okuženih živali, pri katerih smo v poznejši fazi (25 ur) zaznali NO v organih, čeprav je bila skupna raven tako NO kot NO $_x$ še vedno nižja kot pri neokuženih živalih, pa najverjetneje nakazuje zapozneli, a še vedno neučinkoviti imunski odziv gostitelja. Podobno ugotavljata tudi Lamont in Jenkinson (1998), ki menita, da vse opisano kaže, kako odporna na imunski odziv gostitelja je bakterija *P. gingivalis*.

5.2 Sistemska raven dušikovega oksida pri ponavljajoči se peroralni okužbi s *Porphyromonas gingivalis*

Opisano je, da se po trikratni peroralni okužbi s *P. gingivalis* v presledku dveh dni in predhodni desetdnevni sistemski uporabi antibiotikov po 42 dneh pri miših razvije parodontalna bolezen (Baker in sod., 1994; Hardham in sod., 2005). Podobno se ugotavlja tudi pri podganah (Katz s sod. 1999). Kljub temu pa v naši študiji, kjer smo se zaradi možnih vplivov na nastajanje NO rabi antibiotikov izognili, pri miših histološko nismo ugotovili vnetja dlesni. Možno je, da boleznijo nismo uspeli povzročiti zaradi odmrtnosti bakterij, saj po 42 dneh poskusa v ustni votlini nismo uspeli dokazati živih črno pigmentiranih anaerobnih bakterij. Morda pa živih bakterij nismo izolirali tudi zaradi načina odvzema brisa ustne

votline, saj metoda ni zanesljiva za izolacijo zelo majhnega števila bakterij iz ustne votline (Hardham in sod., 2005). Ob tem pa je treba vedeti, da je *P. gingivalis* ATCC 33277 izjemno invaziven sev (Duncan in sod., 1993; Umeda in sod., 2006; Belanger in sod., 2008), ki lahko preživi znotraj epitelnih celic in povzroča vnetni odgovor, čeprav ga sicer ne moremo izolirati (Eick in sod., 2006).

Čeprav bolezenskih sprememb v obzobnih tkivih histološko nismo potrdili, pa smo zaznali značilno zvečanje koncentracije NO_x v plazmi in količine NO v organih s *P. gingivalis* okuženih miši. Nastali NO vsaj deloma izvira iz iNOS, kakor smo dokazali z uporabo iNOS selektivnega inhibitorja 1400W.

Tako pri kontrolnih kot okuženih živalih smo histološko ugotovili blago pljučnico, ki je najverjetneje posledica premestitve živali iz pogojev reje živali, prostih specifičnih patogenih klic (reje SPF živali), in izpostavitve novim okoljskim vplivom in bakterijam. Domnevamo, da je "osnovna raven" NO, ki smo jo zaznali pri kontrolnih živalih, posledica odgovora živali na nove razmere, čeprav v okrogloceličnih infiltratih v pljučnem parenhimu nismo zaznali prisotnosti iNOS.

Ker so bile živali poleg tega pazljivo okužene, da bi se izognili vdihu, in ker nismo zaznali bolezni obzobnih tkiv, je najverjetneje, da sta pri okuženih živalih nastali NO in NO_x posledica ponavljajočega se požiranja bakterije *P. gingivalis* in/ali njenih presnovkov oziroma sestavin.

Pri tem je možnih več mest, kjer pride do prvotnega odziva gostitelja na bakterijo in/ali njene antigene. Poleg že omenjenega imunskega odziva na znotrajcelično prisotnost *P. gingivalis* (Eick in sod., 2006) je poznano tudi, da v odgovoru na zgodnje nabiranje plaka v ustni votlini v celicah pripojnega epitela nastajajo mediatorji vnetja (Wolf in sod., 2005). Tako živa kot mrtva bakterija *P. gingivalis* lahko izzove nastajanje različnih provnetnih citokinov tudi v fibroblastih dlesni (Steffen in sod., 2000). Lipopolisaharidi po Gramu negativnih anaerobnih bakterij v ustni votlini povzročajo tudi mastocitno reakcijo (Abraham in Malaviya, 1997; Malaviya in Abraham, 1998; Walsh, 2003). Slednja je v naši študiji manj verjetna, saj pri histološki preiskavi rezin, obarvanih s toluidinskim modrilom, nismo opazili razlik v številu, umestitvi ali degranulaciji mastocitov v tkivu dlesni pri živalih iz različnih skupin (Walsh, 2003).

Orofaringealno limfatično tkivo je pomembno pri prvotnem imunskem odzivu na antigene, ki vstopajo skozi ustno votlino (Koornstra in sod., 1991; Belz in Heath, 1995). V prebavilih se nahajajo številni mastociti (Malaviya in Abraham, 1998). Že nestimulirane črevesne epitelne celice izražajo receptorje TLR2 in TLR4, ki so pomembni pri zaznavanju patogenov, število

teh receptorjev pa se ob vdoru LPS v črevo še poveča (Swerdlow in sod., 2006). Že prej smo omenili, da je vstop samega LPS v črevo po peroralni okužbi možen in lahko izzove sistemske učinke (Yoshino in sod., 1999).

Glede na rezultate študije sklepamo, da igra obsežen imunski sistem črevesja pomembno vlogo v prirojenem imunskem odzivu gostitelja na okužbo s *P. gingivalis* po peroralni poti. Podobno je opisano za peroralno okužbo miši s *Toxoplasma gondii* (Furuta in sod., 2006) ali pri odzivu gostitelja na prisotnost komezalnih bakterij in/ali njihovih presnovkov v črevesu (Kaiserlian in sod., 2005).

Ne glede na to, kje je dejansko vstopno mesto za *P. gingivalis* in/ali antigene v naši študiji, pa je gotovo, da je bilo 42. dan po okužbi ob času vzorčenja nekje v telesu miši še vedno prisotno vnetno žarišče, saj smo v plazmi izmerili zvečano koncentracijo TNF- α , ki je prvi plazemski kazalec odgovora organizma na LPS (Wolf in sod., 2005). Obenem je znano, da se citokini ne skladiščijo, temveč stalno nastajajo ob dražljaju (Wolf in sod., 2005), za TNF- α pa je značilna zelo kratka razpolovna doba v plazmi (nekaj minut) (Tsutsumi in sod., 1994). TNF- α je obenem tudi pomemben aktivator iNOS (Jean-Baptiste, 2007).

Vloga v organih nastalega NO ostaja nerazjasnjena. Znano je, da igrajo zlasti ledvice in jetra pomembno vlogo pri izločanju LPS in TNF- α iz krvnega obtoka (Tsutsumi in sod., 1994; Yakovlev, 2003), torej bi lahko NO igral vlogo v uravnavanju teh procesov, vendar so možne še številne druge vloge NO (Milbourne in Bygrave, 1995; Poljakovic in sod., 2001).

Glede na opaženo zmanjšanje nastajanja NO pri okuženih živalih, ki so bile hkrati tretirane s selektivnim iNOS inhibitorjem, nastaja NO v ledvicah v največji meri na iNOS. Po drugi strani pa domnevamo, da iNOS v večini organov ni edini vir nastajanja NO po okužbi (Kleinert in sod., 2000), saj tudi ob uporabi selektivnega iNOS inhibitorja pri okuženih živalih nismo dosegli znižanja nastajanja NO do osnovne ravni, izmerjene pri kontrolnih živalih. Možno je, da selektivni inhibitor nima popolnega učinka (Alderton in sod., 2001). Obenem pa pri imunohistokemijski analizi organov nismo opazili nikakršnih razlik med skupinami živali v izražanju iNOS. Opisano je, da se iNOS izraža v jetrnih celicah zdravih jeter ljudi, kjer se pojavlja predvsem v periportalni regiji jeter (McNaughton in sod., 2002), kar pa ni značilnost miši (Han in sod., 2004). Ob tem je potrebno vedeti, da imunohistokemijska analiza ni kvantitativna metoda in ne daje podatkov o aktivnosti encimov, pač pa samo zaznava njihovo prisotnost v tkivu. Zlasti je vprašljiva metoda za določanje iNOS v ledvicah (Holmqvist in sod., 2005). Če bi torej želeli določati encimsko aktivnost iNOS pri neokuženih in okuženih ter z inhibitorji tretiranih živalih, s katero bi bolje presodili, ali je iNOS dejansko vir nastajanja NO v organih, bi bilo treba uporabiti druge tehnike in metode. Ob vsem je seveda

možno, da NO sploh ne nastaja v organih, kjer smo ga izmerili, temveč nekje drugje v telesu, se nato shrani in prenese v organe (ledvice, jetra), kjer je potreben za določene učinke, kot predlagajo tudi drugi avtorji (Muller in sod., 2002; Kim-Shapiro in sod., 2006). Nadaljnje študije, s katerimi bi določili mesto nastajanja NO po ponavljajoči se peroralni okužbi s *P. gingivalis* ter učinke NO v ledvicah in jetrih, bi bile vsekakor zanimive.

5.3 Nitrit/nitrat kot možen kazalec sistemskega nastajanja dušikovega oksida pri peroralnih okužbah s *Porphyromonas gingivalis*

Nitrit/nitrat (NO_x) je stabilni končni produkt metabolizma NO, ki ga lahko zasledimo v bioloških tekočinah (Tsikas, 2005) in odslikava raven v tkivih nastalega NO, zato je možni kazalec aktiviranja imunskega odziva pri vnosu LPS (Jungersten in sod., 1993; Tracey in sod., 1995; Veszelsovsky in sod., 1995; Ellis in sod., 1998; Hayashi in sod., 2005), čeprav so mnenja deljena (Klebanoff in Nathan, 1993; Tsikas, 2005).

Tako pri akutni kot ponavljajoči se okužbi s *P. gingivalis* smo ugotovili, da plazemska koncentracija NO_x natančno zrcali nastajanje NO vsaj v nekaterih organih. Torej bi bila lahko plazemska koncentracija NO_x dober kazalec sistemskega nastajanja NO pri peroralnih okužbah s *P. gingivalis* in zato morda tudi pri parodontalni bolezni.

Pri tem je potrebno vedeti, da nitrit in nitrat v bioloških tekočinah izvira deloma iz prehrane. Ta lahko močno vpliva na variabilnost plazemske koncentracije nitrata, čeprav celo visoka vsebnost nitrata v prehrani ne vpliva na endogeno biosintezo nitrata, ki dodatno prispeva k plazemski koncentraciji NO_x (Green in sod., 1981; Ellis in sod., 1998). Dodatno lahko k zvečanju plazemske koncentracije NO_x prispeva bakterijska razgradnja amino-skupin v črevesju (Wink in sod., 1996). V naših študijah smo se morebitnemu vplivu prehrane izognili z regulirano dieto živali pred poskusom in ves čas trajanja poskusa, v kliničnih študijah pa bi bilo to najverjetneje zahtevnejše.

Če bi želeli plazemsko koncentracijo NO_x določati v vzorcih bolnikov, potem se je potrebno zavedati določenih omejitev, ki jih metoda ima. Nujno je potrebno upoštevati, da lahko nitrit/nitrat, ki je prisoten v epruveh za odvzem krvi, laboratorijskih kemikalijah in opremi, pomembno vpliva na meritve (Dembny in sod., 1998; Ellis in sod., 1998; Ricart-Jane in sod., 2002; Tsikas, 2005), enako tudi obdelava vzorcev (Ellis in sod., 1998; Tsikas, 2005).

Problem v naši študiji bi lahko bila tudi uporaba dušik vsebujočih L-argininskih analogov, kot npr. L-NAME, saj lahko motijo določene analize NO_x (Tsikas in sod., 1998). Kljub temu pa je plazemska raven NO_x v naših študijah natančno odslikavala nastajanje NO v organih, torej

je prispevek L-NAME k plazemskemu NO_x manj verjeten, seveda pa bi bilo idealno takšne spojine iz vzorca plazme pred analizo odstraniti (Tsikas in sod., 1998).

V kliničnih študijah bi bilo torej poleg prehrane nujno upoštevati, da je plazemska koncentracija NO_x odvisna tudi od drugih v telo vnešenih snovi, kakor tudi od endogenih spolnih hormonov (Green in sod., 1981; Ellis in sod., 1998; Verthelyi, 2006).

5.4 Uporaba inhibitorjev sintaz dušikovega oksida

V študiji smo opazili, da inhibitorji NOS ne delujejo enako v tkivih neokuženih in okuženih živali, saj se je ob uporabi inhibitorjev pri neokuženih živalih nastajanje NO v tkivih in NO_x v plazmi zvečalo. Opisani porast je lahko posledica motenega ravnovesja med vsemi tremi izooblikami NOS po uvedbi inhibitorja (Persichini in sod., 2006). Znano namreč je, da se tudi iNOS lahko konstitutivno izraža v nekaterih celicah (Kleinert in sod., 2000; Poljakovic in sod., 2001), kar smo ugotovili tudi z imunohistokemijsko analizo organov neokuženih miši v naši študiji. Povečano nastajanje NO je seveda lahko tudi posledica neencimskega nastajanja NO zaradi uporabe inhibitorjev NOS, kar je opisano za L-NAME (Moroz in sod., 1998), ali je celo posledica ponavljajočega se i.p. dajanja inhibitorja, za kar so nujne dodatne raziskave.

Zanimivo ob tem je, da se inhibitorji že veliko raziskujejo kot možna zdravila za preprečevanje nitroksidativnega stresa, tudi pri gingivitisu in parodontalni bolezni (Di Paola in sod., 2004; Leitao in sod., 2005; Paquette in sod., 2006).

Kot potencialno uporabni se omenjajo predvsem iNOS selektivni inhibitorji, da bi se izognili zavrtju delovanja konstitutivnih NOS, saj le-to poslabša znake bolezni (Babu in Griffith, 1998; Kubes, 2000; Price in sod., 2003; Darmani in sod., 2004). Kljub temu Leitao in sodelavci (2005) omenjajo, da neselektivni inhibitor L-NAME zavira propad čeljustne kosti pri podganah, če se daje 11 dni i.p., vendar učinki na druga tkiva niso preučeni. Ker v naši študiji nismo povzročili vnetja obzobnih tkiv, ocena učinka inhibitorjev seveda ni mogoča, očitno pa je, da na sistemski ravni nima pri okuženih živalih nikakršnega učinka, pri neokuženih pa se sistemsko raven dušikovega oksida po dajanju inhibitorjev poveča.

Tudi uporaba selektivnih iNOS inhibitorjev je po našem mnenju zaenkrat vprašljiva. Opisana je sicer uspešna raba aminogvanidinskih iNOS inhibitorjev pri zdravljenju vnetja obzobnih tkiv (Di Paola in sod., 2004; Leitao in sod., 2005), vendar se je potrebno zavedati, da so aminogvanidini le delno selektivni za iNOS (Alderton in sod., 2001). Inhibitor 1400W, uporabljen v naših študijah, je eden redkih visoko selektivnih iNOS inhibitorjev (Alderton in sod., 2001), čeprav Hayashi in sodelavci (2005) niso potrdili njegove visoke selektivnosti v

posameznih tkivih pri sistemski rabi pri podganah. Delna selektivnost iNOS inhibitorjev bi bila torej lahko dodatni problem, saj bi v zdravih, ali v odziv nevpletelih celicah, lahko prišlo, podobno kot pri rabi neselektivnih inhibitorjev NOS, do zaviranja konstitutivnih NOS in s tem do neravnovesja v delovanju izooblik NOS (Hayashi in sod., 2005). Omenili smo že tudi, da je učinek inhibitorja v različnih tkivih lahko različen (Kozlov in sod., 2003; Hayashi in sod., 2005).

Čeprav je 1400W opisan kot nepovratni inhibitor iNOS (Garvey in sod., 1997; Babu in Griffith, 1998), smo se glede na podatke študij (Parmentier in sod., 1999; Nemeč in sod., 2009) odločili, da miši tretiramo s 1400W vsakih 6 ur.

Še eno vprašanje, ki se ob morebitni uporabi inhibitorjev NOS postavlja, je čas dajanja inhibitorjev. Znano je, da čas dajanja pomembno prispeva k odzivu na okužbo, saj lahko privede do izboljšanja ali poslabšanja klinične slike, ker inhibitorji zavirajo različne NOS v različnih fazah okužbe (Garvey in sod., 1997; Wray in sod., 1998; Kubes, 2000; Hayashi in sod., 2005; Robinson in sod., 2005; Suliburk in sod., 2005).

Tudi pot vnosa inhibitorjev NOS lahko spremeni potek bolezni, pri čemer se lokalno dajanje omenja kot možni vzrok za poslabšanje vnetja (Paul-Clark in sod., 2001).

Opisani so tudi stranski učinki uporabe inhibitorjev pri večtedenski rabi (Pechanova in sod., 1999; Kubes, 2000; Inada in sod., 2002; Bezerra in sod., 2004; Hauser in sod., 2005). L-NAME ima stranske učinke predvsem v ledvicah in srcu (Pechanova in sod., 1999; Inada in sod., 2002), za 1400W pa zaenkrat ni podatkov. Zato smo se v naši študiji odločili za kratkotrajno, petdnevno uporabo inhibitorjev ob koncu poskusa.

Zaradi številnih vprašanj glede selektivnosti, odmerka, načina dajanja, intervalov med posameznimi odmerki kot tudi glede trajanja uporabe inhibitorjev NOS, so potrebne obsežnejše študije, preden bi lahko inhibitorje NOS vključili v zdravljenje vnetja dlesni in parodontalne bolezni. Poleg tega je aktivnost iNOS nujno potrebna pri obrambi pred bakterijami, tudi pred *P. gingivalis* (Cherayil in Antos, 2001; Eisenstein, 2001; Chakravorty in Hensel, 2003; Gyurko in sod., 2003; Skalarič in sod., 2006; Hajishengallis in sod., 2008), in je zato zaviranje delovanja iNOS vprašljivo.

6 SKLEPI

1. Ugotovili smo, da v akutni fazi odziva po peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* sistemska raven dušikovega oksida ni le manjša kot pri akutni peroralni okužbi z *E. coli*, pač pa je zmanjšana tudi glede na raven dušikovega oksida pri neokuženih živalih, kot smo dokazali z meritvijo plazemske koncentracije NO_x in z odkrivanjem NO v organih z metodo EPR.

2. Pri ponavljajoči se peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* je sistemsko povečano nastajanje NO, kot smo dokazali z meritvijo plazemske koncentracije NO_x in z odkrivanjem NO v organih z metodo EPR.

3. Pri skupinah miši, ki smo jih večkrat peroralno okužili s *P. gingivalis*, s histološko analizo nismo ugotovili vnetja obzobnih tkiv. Čeprav smo s histološko analizo ugotovili okroglocelične infiltrate v pljučih vseh živalih, pa med neokuženo in okuženo skupino miši nismo ugotovili razlik. Vnetne spremembe na pljučih so najverjetneje posledica spremembe okolja. Povečano sistemsko nastajanje NO in NO_x pri okuženi skupini miši pa je torej najverjetneje posledica zgolj ponavljajočega se požiranja *P. gingivalis*.

4. Povečano nastajanje NO v ledvicah in jetrih okuženih živali je v veliki meri posledica aktiviranja iNOS, saj smo pri okuženih živalih, tretiranih s selektivnim inhibitorjem iNOS, zaznali zmanjšano nastajanje NO. Kljub temu pa ostaja vprašljivo, ali je iNOS pri okuženih živalih dejansko aktivirana v ledvicah in jetrih, saj z imunohistokemijsko analizo nismo zasledili razlik v izražanju iNOS v teh organih med okuženimi in neokuženimi živalmi.

5. Meritve plazemske koncentracije NO_x odlikavajo nastajanje NO v nekaterih organih, zato je NO_x možen kazalec sistema nastajanja NO pri peroralnih okužbah s *P. gingivalis*. Zaradi enostavnega določanja NO_x v krvi in urinu bi lahko bile te meritve zanimiva metoda za spremljanje sistema nastajanja NO tudi pri bolnikih s parodontalno boleznijo.

6. Čeprav je študiji akutne in ponavljajoče se peroralne okužbe s *P. gingivalis* težko primerjati predvsem zaradi razlik v načinu okužbe živali, pa iz rezultatov obeh študij

sklepamo, da zmanjšanje sistemske ravni NO v akutni fazi odziva na okužbo kaže na prehodno toleriranje gostitelja na prisotnost bakterije *P. gingivalis*.

7. Pri prenosu pridobljenih znanj na druge živalske vrste in ljudi se je potrebno zavedati nekaterih posebnosti, ki veljajo pri miših. Znano je na primer, da se mišji makrofagi izjemno hitro odzivajo s tvorbo NO, medtem ko bi jih bilo pri ljudeh potrebno dlje stimulirati s kombinacijo citokinov.

7 POVZETEK

Prosti radikal dušikovega oksida (NO) je pomembna znotrajcelična in medcelična sporočevalna molekula. Povečano nastajanje NO, ki je pomembno v imunskem odzivu in hkrati lahko vodi do poškodb gostiteljevih tkiv, je lahko posledica aktiviranja sprožljive sintaze dušikovega oksida (iNOS) zaradi izpostavljenosti organizma bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) ali citokinom, kot je podrobno opisano pri septičnem šoku. Podatki o sistemskem nastajanju NO po peroralnih okužbah so skopi. V predhodni študiji smo ugotovili, da je sistemska raven NO zvečana v akutni fazi odziva po peroralni okužbi z bakterijo *E. coli*. Znano je, da NO nastaja lokalno pri parodontalni bolezni. Ker bakterije iz ustne votline povzročajo tudi sistemske učinke, obenem pa je *in vitro* opisano tudi nastajanje NO po stimuliranju celic s *P. gingivalis*, je sistemsko nastajanje NO zaradi aktiviranja iNOS pri peroralnih okužbah s parodontalno patogeno bakterijo *P. gingivalis* zelo verjetno. Slednje smo želeli preveriti na modelu akutne in ponavljajoče se peroralne okužbe miši s *P. gingivalis*, pri čemer smo kot izhodišče uporabili znanje, pridobljeno iz študije akutnega odziva na peroralno okužbo z *E. coli*.

V t.i. akutni model študije smo vključili osemnajst BALB/c miši ženskega spola, ki smo jih peroralno okužili z 0,1 ml suspenzije živih bakterij *P. gingivalis* ATCC 33277 (10^9 /ml CFU). V različnih obdobjih po okužbi smo v plazmi miši merili koncentracijo nitrita/nitrata (NO_x), v pljučih, aorti, srcu, jetrih, vranici, ledvicah in v možganih pa z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR) količino NO. Rezultate smo primerjali z rezultati, ki smo jih dobili pri 11 kontrolnih živalih. Enake meritve ter meritve plazemske koncentracije TNF- α smo opravljali po 42 dneh tudi na skupinah miši, ki smo jih okuževali s *P. gingivalis* ali sterilnim gojiščem trikrat v presledku 48 ur. Da bi določili izvor NO, smo pri tej študiji dodatno vključili živali, ki smo jih tretirali z inhibitorji NOS. S histološkim pregledom obzobnih tkiv smo preverjali, ali je okužba s *P. gingivalis* po 42 dneh povzročila vnetje obzobnih tkiv. Z imunohistokemijsko analizo pljuč, jeter in ledvic pa smo ugotavljali, ali je okužba povzročila povečano izražanje iNOS v teh organih.

V akutni fazi odziva po peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* je bila sistemska raven dušikovega oksida statistično značilno manjša glede na raven dušikovega oksida pri neokuženih živalih, kot smo dokazali z meritvijo plazemske koncentracije NO_x in količine NO v organih. Pri ponavljajoči se peroralni okužbi z bakterijo *P. gingivalis* pa smo ugotovili sistemsko povečano nastajanje NO v organih in NO_x v plazmi, čeprav smo tudi pri okuženih

živalih ugotovili, da so obzobna tkiva zdrava. Pri okuženih živalih, ki smo jih tretirali s selektivnim inhibitorjem iNOS 1400W, smo opazili zmanjšano nastajanje NO in NO_x, neselektivni inhibitor L-NAME pa ni imel bistvenega učinka. Uporaba enega ali drugega inhibitorja je bila pri neokuženih živalih povezana s sistemskim porastom NO. Pri imunohistokemijski analizi nismo v nobenem primeru v pljučih, jetrih in ledvicah ugotovili razlik v izražanju iNOS med skupinami živali. Tako pri modelu akutne kot kronične okužbe miši s *P. gingivalis* smo ugotovili, da NO_x dobro zrcali nastajanje NO v organih.

Glede na to, da smo pri vseh živalih, kronično okuženih s *P. gingivalis*, ugotovili zdrava obzobna tkiva ter nobenih histoloških razlik v zdravju pljučnega tkiva med okuženimi in neokuženimi živalmi, sklepamo, da do vdihavanja okužene vsebine ni prišlo in da je povečano nastajanje NO in NO_x pri okuženi skupini miši posledica zgolj ponavljajočega se požiranja *P. gingivalis*. Čeprav NO v veliki meri izvira iz iNOS, pa ostaja vprašljivo, ali je iNOS pri okuženih živalih dejansko aktivirana v ledvicah in jetrih, saj z imunohistokemijsko analizo nismo zasledili razlik v izražanju iNOS v teh organih med okuženimi in neokuženimi živalmi. Možno je, da se iNOS aktivira drugje, nastali NO pa se stabilizira, shrani in prenese do ledvic in jeter, kjer je nujno potreben za določene učinke.

Čeprav je študiji akutne in ponavljajoče se peroralne okužbe s *P. gingivalis* težko primerjati predvsem zaradi razlik v načinu okužbe živali, pa iz rezultatov obeh študij sklepamo, da zmanjšanje sistemske ravni NO v akutni fazi odziva na okužbo kaže na prehodno gostiteljevo toleriranje prisotnosti bakterije *P. gingivalis*. Zanimive bi bile nadaljnje študije na bolnikih s parodontalno boleznijo, pri čemer bi se lahko poslužili meritev plazemske koncentracije NO_x kot dobrega kazalec sistemskega nastajanja NO pri peroralnih okužbah s *P. gingivalis*, čeprav se je pri prenosu pridobljenih znanj na druge živalske vrste in ljudi potrebno zavedati nekaterih omejitev, ki jih model miši prinaša.

8 SUMMARY

Nitric oxide free radicle (NO) is an important intra- and intercellular messenger molecule. High NO levels, which are formed by inducible nitric oxide synthase (iNOS) as a part of the immune response to lipopolysaccharide (LPS) or cytokine exposure, can have toxic effects as is very well described in septic shock. There is, however, only very limited knowledge regarding systemic NO responses to peroral infection. We have observed a systemic increase in NO in the acute phase following peroral exposure to *E. coli*. Local NO production is also described in patients with periodontal disease. As oral bacteria are known to induce systemic effects and *in vitro* NO formation is described after stimulation of cells with *P. gingivalis*, oral *P. gingivalis* infection is expected to result in iNOS induction and a systemic NO response. This was studied using murine models of acute and chronic peroral *P. gingivalis* exposure, using our previous *E. coli* study as a basis.

Eighteen BALB/c female mice were included in the acute model study. They were perorally inoculated with 0,1 ml suspension of live *P. gingivalis* ATCC 33277 (10^9 CFU/ml). Plasma nitrite and nitrate (NO_x) and NO production detected by electron paramagnetic resonance (EPR) in various organs (lungs, aorta, heart, liver, spleen, kidneys and brain) were measured at intervals after inoculation and levels were compared with those found in 11 control animals. Organ NO and both plasma NO_x and TNF- α measurements were also performed 42 days after chronic exposure, the mice being inoculated three times at 48 hour intervals with either *P. gingivalis* or sterile broth. NOS inhibitors were included in the study to determine the source of NO. Histological examination of peridontal tissues was performed to detect any periodontal disease in *P. gingivalis* inoculated animals, and immunohistochemical detection of iNOS was performed on lung, liver and kidney samples.

Systemic NO levels were reduced at all time intervals after a single peroral inoculation with *P. gingivalis* as determined by plasma NO_x measurements and NO detection in organs. Repeated peroral *P. gingivalis* inoculation, however, induced organ NO and plasma NO_x formation, although no signs of gingivitis were observed in inoculated animals. *P. gingivalis* inoculated mice concurrently treated with iNOS selective inhibitor 1400W were showing reduced NO and NO_x levels, but nonselective NOS inhibitor L-NAME had no effect. Increased NO and NO_x levels were, however, detected in uninoculated animals treated with either type of the inhibitor. No differences in iNOS immunoreactivity were observed between the livers, kidneys and lungs of animals from the different groups. Plasma NO_x levels

positively correlated with NO formation in some organs (liver, lungs, kidneys) in acute and chronic model studies.

Since no differences in gingival and lung tissues health were observed between inoculated and uninoculated animals, we assume that aspiration did not occur and that chronic *P. gingivalis* ingestion is enough to induce a systemic NO and NO_x response. The results from 1400W use indicate that the NO most likely derives from iNOS. However, it is still not clear if it derives from iNOS in the liver and kidneys as there were no differences in the iNOS immunoreactivity in livers and kidneys from inoculated and uninoculated animals. It is therefore possible, that iNOS is activated elsewhere, NO produced being stabilized, stored, transported to kidneys and liver with subsequent release to have remote effects.

It is difficult to compare the results of the studies on acute and chronic NO response to *P. gingivalis* inoculation mainly due to differences in the inoculation method. However, looking at systemic NO production, it seems likely that a significant host response to *P. gingivalis* only occurs with chronic stimulation, whilst acute exposure actually reduces NO production. This could indicate initial tolerance of the body to the presence of *P. gingivalis*. Further studies including investigation of plasma NO_x in patients with naturally occurring periodontal disease would therefore be interesting as our studies suggest plasma NO_x may be a useful biomarker of systemic NO production. It should, however, be remembered, that there are limitations when transferring the knowledge obtained from mice to other species, including humans.

9 ZAHVALE

Cenjenemu mentorju, *prof. dr. Zlatku Pavlici*. Iskrena hvala za raziskovalno idejo in za prostor, ki ga ustvarja, da zamisli lahko zorijo. Za zaupanje in na stežaj odprta vrata v svet veterinarske stomatologije.

Spoštovanemu somentorju, *prof. dr. Milanu Petelinu*. Najlepša hvala za zaupanje v naše delo in za spodbudne načrte v prihodnosti.

Spoštovanim – predsedniku *prof. dr. Urošu Skaleriču* in članom komisije za oceno doktorske disertacije, *znan. svet. dr. Marjeti Šentjunc*, *doc. dr. Ireni Zdovc* in *prof. dr. Gregorju Fazarincu*. Hvala za kritiko našega dela, mnoge nasvete, usmeritve in spodbude in za izjemno priložnost, da se lahko učim od vas.

Dr. David A. Crossley. Saying Thank you is at least something I could do to show how much I appreciate your support and deep involvement in the research and professional work I am interested in. And thank you for all the corrections in the English texts.

Asist. Damijanu Erženu za opravljene statistične obdelave podatkov in *dr. Alešu Jerinu*, *doc. dr. Milki Vrecl* ter *prof. dr. Gregorju Majdiču* za pomoč pri obdelavi vzorcev in interpretaciji rezultatov. Navdušujoče je biti del takšne ekipe.

Marjani Nemeč in *Jasni Šporar*. Za to, da spektrometer EPR in mikrotom nista bili neobvladljivi napravi. *Ani Sepe* za začetne študije NMR.

Katerini Kovačević Čeh, *Tanji Španič* in *Tomažu Budefeldu*. Za čudovit pristop k delu s poskusnimi živalmi in za to, da so celo imunohistokemijski postopki postali zanimivi.

Sodelavcem Inštituta za higieno in patologijo prehrane živali VF. Za brezvetrije pri natančnih zatehtah kemikalij.

Mag. Giti Grečs Smole za pomoč pri pregledu literature in *lektorju Jožetu Faganelu*, *prof., višjemu strokovnemu sodelavcu specialistu ZRC SAZU*, za lektoriranje teksta ter *Alešu Budkoviču* in *Božu Pircu* za umirjanje panike, ko računalniški monitor počrni.

Mami in Tatu. Za odobravanje večine mojega početja in brezmejno podporo. Za vse zgodaj naloženo delo in številna pohajanja. Če se hoče, se vse da. Ker se veselim vsakega dne.

Tamari. Za vse strategije pristopov k problemom. Za vsa prva branja. Za to, da razumeš, če se mi danes ne da.

Aleksu. Za tvojo umirjenost, stabilnost, zanesljivo protiutež in Veliko Rdeče v dveh kozarcih.

Tanji. Za čudovite dni tudi na interni 305. Za vero v stroko in doseganje ciljev. Smisel je najbrž v poti do tja?

Tomažu. Za vse misli dneva, v predalu elektronske pošte in na razglednicah. Za okus, ki ostane po pogovorih s tabo.

Jožku. Za kipeče znanje o manj znanih živalskih vrstah. Za ščepec hudomušnosti, prgišče nečimrnosti in šelestenje sanj.

Marku, Cvetki, Petri, Maji, Petru. Za vse o vseh glodavcih in lagomorfih. Za nalezljivo prijetno delovno vzdušje in peruti, ki jih človek lahko spet najde pri vas.

Tini. Za ure in ure ob miškah in ker tudi ti verjameš v več kot le v zanimivo delo.

Ani. Za praznike, preživete v laboratoriju.

Sodelavcem s KKMŽ. Za spodbude, da je možno več.

Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije za štipendiranje raziskav in državi Sloveniji za finančno podporo vsa leta izobraževanja. Verjamem, da je pot prava.

Tebi. Za dvom. In za smisel.

10 LITERATURA

- 1 Abraham SN, Malaviya R (1997). Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun* 65: 3501-8.
- 2 Ahren C, Jungersten L, Sandberg T (1999). Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in patients with acute infectious diseases. *Scand J Infect Dis* 31: 405-7.
- 3 Alayan J, Ivanovski S, Gemmell E et al. (2006). Deficiency of iNOS contributes to *Porphyromonas gingivalis*-induced tissue damage. *Oral Microbiol Immunol* 21: 360-5.
- 4 Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615.
- 5 Awano S, Ansai T, Takata Y et al. (2008). Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res* 87: 334-9.
- 6 Babu BR, Griffith OW (1998). Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 2: 491-500.
- 7 Baker PJ (2005). Genetic control of the immune response in pathogenesis. *J Periodontol* 76: 2042-6.
- 8 Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC (2000). Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice. *Infect Immun* 68: 5864-8.
- 9 Baker PJ, Evans RT, Roopenian DC (1994). Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* 39: 1035-40.
- 10 Belanger M, Reyes L, von Deneen K et al. (2008). Colonization of maternal and fetal tissues by *Porphyromonas gingivalis* is strain-dependent in a rodent animal model. *Am J Obstet Gynecol* 199 (1): 86 e1-7.
- 11 Belz GT, Heath TJ (1995). Lymph pathways of the medial retropharyngeal lymph node in dogs. *J Anat* 186 (3): 517-26.
- 12 Berliner LJ, Fujii H (2004). In vivo spin trapping of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 6: 649-56.
- 13 Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S et al. (2004). Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 141: 172-82.
- 14 Bodet C, Chandad F, Grenier D (2006). *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammatory mediator profile in an ex-vivo human whole blood model. *Clin Exp Immunol* 143: 50-7.
- 15 Bonner FT (1996). Nitric oxide gas. *Methods Enzymol* 268: 50-7.
- 16 Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD (2003). The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol* 48: 93-100.
- 17 Bretz WA, Weyant RJ, Corby PM et al. (2005). Systemic inflammatory markers, periodontal diseases, and periodontal infections in an elderly population. *J Am Geriatr Soc* 53: 1532-7.
- 18 Brock GR, Butterworth CJ, Matthews JB, Chapple IL (2004). Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *J Clin Periodontol* 31: 515-21.

- 19 Bultinck J, Sips P, Vakaet L, Brouckaert P, Cauwels A (2006). Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock. *FASEB J* 20: 2363-5.
- 20 Byrne Habič B, Mravljak J, Pečar S (2004). Dušikov oksid I: lastnosti, kemična reaktivnost in nastajanje NO v organizmu. *Farm Vestn* 55: 469-78.
- 21 Chakravorty D, Hensel M (2003). Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes Infect* 5: 621-7.
- 22 Cherayil BJ, Antos D (2001). Inducible nitric oxide synthase and Salmonella infection. *Microbes Infect* 3: 771-6.
- 23 Choi EY, Hwang YM, Lee JY et al. (2007). Lipid A-associated proteins from *Porphyromonas gingivalis* stimulate release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *J Periodontal Res* 42: 350-60.
- 24 Dambrova M, Kirjanova O, Bauman L et al. (2003). EPR investigation of in vivo inhibitory effect of guanidine compounds on nitric oxide production in rat tissues. *J Physiol Pharmacol* 54: 339-47.
- 25 Darmani H, Crossan JC, Curtis A (2004). Single dose of inducible nitric oxide synthase inhibitor induces prolonged inflammatory cell accumulation and fibrosis around injured tendon and synovium. *Mediators Inflamm* 13: 157-64.
- 26 DeBowes LJ, Mosier D, Logan E et al. (1996). Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *J Vet Dent* 13: 57-60.
- 27 Dembny KD, Roza AM, Johnson C, Adams MB, Pieper GM (1998). Heparin interferes with the determination of plasma nitric oxide by inhibition of enzymatic conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase. *Clin Chim Acta* 275: 107-14.
- 28 Deora AA, Lander HM (2000). Role of nitric oxide and other radicals in signal transduction. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 251-63.
- 29 Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E et al. (2004). Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res* 83: 343-8.
- 30 Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H (1993). Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 61: 2260-5.
- 31 Ebersole JL, Cappelli D, Mathys EC et al. (2002). Periodontitis in humans and non-human primates: oral-systemic linkage inducing acute phase proteins. *Ann Periodontol* 7: 102-11.
- 32 Eick S, Reissmann A, Rodel J, Schmidt KH, Pfister W (2006). *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol* 21: 231-7.
- 33 Eisenstein TK (2001). Implications of Salmonella-induced nitric oxide (NO) for host defense and vaccines: NO, an antimicrobial, antitumor, immunosuppressive and immunoregulatory molecule. *Microbes Infect* 3: 1223-31.
- 34 Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK (1998). Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31: 195-220.
- 35 Engebretson S, Chertog R, Nichols A et al. (2007). Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol* 34: 18-24.

- 36 Ersoy Y, Ozerol E, Baysal O et al. (2002). Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 61: 76-8.
- 37 Felice P, Pelliccioni GA, Checchi L (2005). Periodontal disease as a risk factor in pregnancy. *Minerva Stomatol* 54: 255-64.
- 38 Franek E, Blach A, Witula A et al. (2005). Association between chronic periodontal disease and left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients. *Transplantation* 80: 3-5.
- 39 Frolov I, Houry-Hadad Y, Soskolne A, Shapira L (1998). In vivo exposure to *Porphyromonas gingivalis* up-regulates nitric oxide but suppresses tumour necrosis factor- α production by cultured macrophages. *Immunology* 93: 323-8.
- 40 Fukuto JM, Cho JY, Switzer CH (2000). The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 23-40.
- 41 Furuta T, Kikuchi T, Akira S, Watanabe N, Yoshikawa Y (2006). Roles of the small intestine for induction of toll-like receptor 4-mediated innate resistance in naturally acquired murine toxoplasmosis. *Int Immunol* 18: 1655-62.
- 42 Ganster RW, Geller DA (2000). Molecular regulation of inducible nitric oxide synthase. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 129-56.
- 43 Gao C, Guo H, Wei J et al. (2005). Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide* 12: 121-6.
- 44 Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES et al. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272: 4959-63.
- 45 Gašperšič R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U (2002). Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci* 110: 125-9.
- 46 Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ (2002). Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 17-34.
- 47 Gilbert AD, Sofaer JA (1988). Host genotype, pathogenic challenge and periodontal bone loss in the mouse. *Arch Oral Biol* 33: 855-61.
- 48 Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Jr. (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 268: 142-51.
- 49 Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA et al. (1981). Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7764-8.
- 50 Grenier D, Imbeault S, Plamondon P et al. (2001). Role of gingipains in growth of *Porphyromonas gingivalis* in the presence of human serum albumin. *Infect Immun* 69: 5166-72.
- 51 Grenier D, Mayrand D (1987a). Functional characterization of extracellular vesicles produced by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 55: 111-7.
- 52 Grenier D, Mayrand D (1987b). Selected characteristics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol* 25: 738-40.

- 53 Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR, Jr. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 268: 237-46.
- 54 Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L (1997). Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 9: 138-42.
- 55 Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A et al. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274: 177-88.
- 56 Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MW (2006). Differential effects of selective and non-selective inhibition of nitric oxide synthase on the expression and activity of cyclooxygenase-2 during gastric ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 536: 301-8.
- 57 Gyurko R, Boustany G, Huang PL et al. (2003). Mice lacking inducible nitric oxide synthase demonstrate impaired killing of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 71: 4917-24.
- 58 Hajishengallis G, Sharma A, Russell MW, Genco RJ (2002). Interactions of oral pathogens with toll-like receptors: possible role in atherosclerosis. *Ann Periodontol* 7: 72-8.
- 59 Hajishengallis G, Wang M, Bagby GJ, Nelson S (2008). Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Immunol* 181: 4141-9.
- 60 Halliwell B, Gutteridge MCJ (1999a). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 73-82.
- 61 Halliwell B, Gutteridge MCJ (1999b). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 324-5.
- 62 Halliwell B, Gutteridge MCJ (1999c). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 372-7.
- 63 Halliwell B, Gutteridge MCJ (1999d). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 462.
- 64 Han X, Fink MP, Uchiyama T, Yang R, Delude RL (2004). Increased iNOS activity is essential for hepatic epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G126-36.
- 65 Han YW, Redline RW, Li M et al. (2004). *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect Immun* 72: 2272-9.
- 66 Hardham J, Reed M, Wong J et al. (2005). Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine* 23: 3148-56.
- 67 Harris HW, Kasravi FB (2003). Lipoprotein-bound LPS induces cytokine tolerance in hepatocytes. *J Endotoxin Res* 9: 45-50.
- 68 Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Venkatesh B (2005). Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg* 101: 488-98.
- 69 Hayashi Y, Abe M, Murai A et al. (2005). Comparison of effects of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors on plasma nitrite/nitrate levels and tissue NOS activity in septic organs. *Microbiol Immunol* 49: 139-47.

- 70 Hof H, Christen A, Hacker J (1986). Comparative therapeutic activities of ciprofloxacin, amoxicillin, ceftriaxone and co-trimoxazole in a new model of experimental infection with *Escherichia coli*. *Infection* 14: 190-4.
- 71 Hofstetter C, Flondor M, Boost KA et al. (2005). A brief exposure to isoflurane (50 s) significantly impacts on plasma cytokine levels in endotoxemic rats. *Int Immunopharmacol* 5: 1519-22.
- 72 Holmqvist B, Olsson CF, Svensson ML et al. (2005). Expression of nitric oxide synthase isoforms in the mouse kidney: cellular localization and influence by lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4. *J Mol Histol* 36: 499-516.
- 73 Hu SW, Huang CH, Huang HC, Lai YY, Lin YY (2006). Transvascular dissemination of *Porphyromonas gingivalis* from a sequestered site is dependent upon activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Periodontal Res* 41: 200-7.
- 74 Huang JH, Lin YY, Lai YY, Hu SW (2006). Lethal outcome caused by *Porphyromonas gingivalis* A7436 in a mouse chamber model is associated with elevated titers of host serum interferon-gamma. *Oral Microbiol Immunol* 21: 100-6.
- 75 Huxley EJ, Viroslav J, Gray WR, Pierce AK (1978). Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 64: 564-8.
- 76 Hwang YH, Park BK, Lim JH et al. (2007). Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. *Eur J Pharmacol* 556: 166-71.
- 77 Imamura T, Travis J, Potempa J (2003). The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr Protein Pept Sci* 4: 443-50.
- 78 Inada H, Ono H, Minami J, Ishimitsu T, Matsuoka H (2002). Nipradilol prevents L-NAME-exacerbated nephrosclerosis with decreasing of caspase-3 expression in SHR. *Hypertens Res* 25: 433-40.
- 79 Izumi N, Nagaoka T, Mori F et al. (2006). Relation between plasma nitric oxide levels and diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 50: 465-8.
- 80 Jean-Baptiste E (2007). Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med* 22: 63-72.
- 81 Jungersten L, Edlund A, Hafstrom LO et al. (1993). Plasma nitrate as an index of immune system activation in animals and man. *J Clin Lab Immunol* 40: 1-4.
- 82 Kaiserlian D, Cerf-Bensussan N, Hosmalin A (2005). The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J Leukoc Biol* 78: 311-8.
- 83 Kalyanaraman B (1996). Detection of nitric oxide by electron spin resonance in chemical, photochemical, cellular, physiological, and pathophysiological systems. *Methods Enzymol* 268: 168-87.
- 84 Kasravi FB, Lee DH, Weisgraber K, Harris HW (2005). Lipoprotein-bound endotoxin exerts an immunomodulatory effect on hepatocytes through the lipid A domain of LPS. *J Endotoxin Res* 11: 19-24.
- 85 Katz J, Ward DC, Michalek SM (1996). Effect of host responses on the pathogenicity of strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 11: 309-18.
- 86 Kawashima N, Nakano-Kawanishi H, Suzuki N, Takagi M, Suda H (2005). Effect of NOS inhibitor on cytokine and COX2 expression in rat pulpitis. *J Dent Res* 84: 762-7.
- 87 Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM (2000). Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts.

J Periodontal Res 35: 194-200.

88 Kikawada M, Iwamoto T, Takasaki M (2005). Aspiration and infection in the elderly: epidemiology, diagnosis and management. *Drugs Aging* 22: 115-30.

89 Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT (2006). Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 697-705.

90 Kim SJ, Choi EY, Cho YJ et al. (2006). Surface-associated material from *Porphyromonas gingivalis* stimulates the release of nitric oxide by inducing expression of inducible nitric oxide synthase. *Microbes Infect* 8: 470-7.

91 Klebanoff SJ, Nathan CF (1993). Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 192-6.

92 Kleinert H, Boissel JP, Schwarz PM, Foerstermann U (2000). Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoforms. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 105-28.

93 Kleschyov AL, Munzel T (2002). Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol* 359: 42-51.

94 Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A et al. (2003). Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* 93: e104-12.

95 Ko WC, Chiang SR, Yan JJ, Chuang YC (2005). Comparative pathogenicity of bacteraemic isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 11: 553-8.

96 Komarov AM, Mak IT, Weglicki WB (1997). Iron potentiates nitric oxide scavenging by dithiocarbamates in tissue of septic shock mice. *Biochim Biophys Acta* 1361: 229-34.

97 Komarov AM, Reif A, Schmidt HH (2002). In vitro detection of nitric oxide and nitroxyl by electron paramagnetic resonance. *Methods Enzymol* 359: 18-27.

98 Koornstra PJ, de Jong FI, Vlek LF, Marres EH, van Breda Vriesman PJ (1991). The Waldeyer ring equivalent in the rat. A model for analysis of oronasopharyngeal immune responses. *Acta Otolaryngol* 111: 591-9.

99 Kozlov AV, Szalay L, Umar F et al. (2003). Epr analysis reveals three tissues responding to endotoxin by increased formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 34: 1555-62.

100 Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL (2001). The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 13: 104-8.

101 Kubes P (2000). Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 47: 6-9.

102 Kumwenda ZL, Wong CB, Johnson JA et al. (2002). Chylomicron-bound endotoxin selectively inhibits NF-kappaB activation in rat hepatocytes. *Shock* 18: 182-8.

103 Lai CS, Komarov AM (1994). Spin trapping of nitric oxide produced in vivo in septic-shock mice. *FEBS Lett* 345: 120-4.

104 Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA et al. (2003). Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1405-11.

- 105 Lamont RJ, Jenkinson HF (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244-63.
- 106 Lancaster JR (1996). Diffusion of free nitric oxide. *Methods Enzymol* 268: 31-50.
- 107 Lancaster JR, Jr. (2000). The physical properties of nitric oxide. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 209-224.
- 108 Lancaster JR, Jr. (2006). Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol* 19: 1160-74.
- 109 Leitao RF, Ribeiro RA, Chaves HV et al. (2005). Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 76: 956-63.
- 110 Liaudet L, Rosselet A, Schaller MD et al. (1998). Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. *J Infect Dis* 177: 127-32.
- 111 Lin YY, Huang JH, Lai YY, Huang HC, Hu SW (2005). Tissue destruction induced by *Porphyromonas gingivalis* infection in a mouse chamber model is associated with host tumor necrosis factor generation. *Infect Immun* 73: 7946-52.
- 112 Liu L, Yan Y, Zeng M et al. (2004). Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* 116: 617-28.
- 113 Liu R, Desta T, Raptis M, Darveau RP, Graves DT (2008). *P. gingivalis* and *E. coli* lipopolysaccharides exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *J Periodontol* 79: 1241-7.
- 114 Malaviya R, Abraham SN (1998). Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J Mol Med* 76: 617-23.
- 115 Marks M, Burns T, Abadi M et al. (2007). Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun* 75: 1586-97.
- 116 Masters BS (2000). Structural variations to accommodate functional themes of the isoforms of NO synthases. In: Ignarro LJ, ed. *Nitric oxide: biology and pathobiology*. San Diego: Academic Press, 91-104.
- 117 McCluskie K, Birrell MA, Wong S, Belvisi MG (2004). Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide-induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 625-33.
- 118 McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA et al. (2002). Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17161-6.
- 119 Medzhitov R (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-45.
- 120 Mikoyan VD, Kubrina LN, Serezhenkov VA, Stukan RA, Vanin AF (1997). Complexes of Fe²⁺ with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues: comparative investigations. *Biochim Biophys Acta* 1336: 225-34.
- 121 Milbourne EA, Bygrave FL (1995). Does nitric oxide play a role in liver function? *Cell Signal* 7: 313-8.

- 122 Miranda KM, Espey MG, Jour'dheuil D et al. (2000). The chemical biology of nitric oxide. In: Ignarro LJ, ed. Nitric oxide: biology and pathobiology. San Diego: Academic Press, 41-55.
- 123 Miyakawa H, Sato K, Shinbori T et al. (2002). Effects of inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase inhibitors on SEB-induced interstitial pneumonia in mice. *Eur Respir J* 19: 447-57.
- 124 Moroz LL, Norby SW, Cruz L et al. (1998). Non-enzymatic production of nitric oxide (NO) from NO synthase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 571-6.
- 125 Mravljak M, Byrne Habič B, Pečar S (2005). Dušikov oksid II: biološki učinki in učinkovine, ki sproščajo NO. *Farm Vestn* 56: 11-6.
- 126 Muller B, Kleschyov AL, Alencar JL, Vanin A, Stoclet JC (2002). Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci* 962: 131-9.
- 127 Nemeč A, Pavlica Z, Crossley DA et al. (2009). Single oral inoculation with *Escherichia coli* (ATCC 25922) stimulates generalised production of nitric oxide in mice. *Acta Vet Hung* 57 (1): 127-38.
- 128 O'Grady NP, Preas HL, Pugin J et al. (2001). Local inflammatory response following bronchial endotoxin instillation in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1591-8.
- 129 Okuda K, Kimizuka R, Abe S, Kato T, Ishihara K (2005). Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia. *J Periodontol* 76: 2154-60.
- 130 Paju S, Scannapieco FA (2007). Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 13: 508-12.
- 131 Paquette DW (2002). The periodontal infection-systemic disease link: a review of the truth or myth. *J Int Acad Periodontol* 4: 101-9.
- 132 Paquette DW, Rosenberg A, Lohinai Z et al. (2006). Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical mercaptoalkylguanidines. *J Periodontol* 77: 385-91.
- 133 Parmentier S, Bohme GA, Lerouet D et al. (1999). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol* 127: 546-52.
- 134 Paul-Clark MJ, Gilroy DW, Willis D, Willoughby DA, Tomlinson A (2001). Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J Immunol* 166: 1169-77.
- 135 Pavlica Z, Nemeč A, Nemeč-Svete A et al. (2008). Local and systemic up-regulation of TNF α , IL-1 β and IL-6 in mice intratracheally inoculated with *Porphyromonas gingivalis*. *Acta Vet Brno* 77: 377-85.
- 136 Pavlica Z, Petelin M, Nemeč A, Eržen D, Skalerič U (2004). Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. *Am J Vet Res* 65: 1584-8.
- 137 Pechanova O, Bernatova I, Babal P (1999). Structural alterations in the heart after long-term L-NAME and D-NAME treatment. *Gen Physiol Biophys* 18 (Suppl 1): 6-9.
- 138 Persichini T, Cantoni O, Suzuki H, Colasanti M (2006). Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid Redox Signal* 8: 949-54.
- 139 Petelin M, Naruishi K, Shiomi N et al. (2004). Systemic up-regulation of sTNFR2 and IL-6 in *Porphyromonas gingivalis* pneumonia in mice. *Exp Mol Pathol* 76: 76-81.

- 140 Plonka PM, Chlopicki S, Wisniewska M, Plonka BK (2003). Kinetics of increased generation of (.)NO in endotoxaemic rats as measured by EPR. *Acta Biochim Pol* 50: 807-13.
- 141 Poljakovic M, Svensson ML, Svanborg C et al. (2001). *Escherichia coli*-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the mouse bladder and kidney. *Kidney Int* 59: 893-904.
- 142 Pollard TD, Earnshaw WC (2004). *Cell biology*. Philadelphia: Saunders, 423-43.
- 143 Price S, Mitchell JA, Anning PB, Evans TW (2003). Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis. *Eur J Pharmacol* 472: 111-8.
- 144 Pulendran B, Kumar P, Cutler CW et al. (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* 167: 5067-76.
- 145 Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P et al. (2007). Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1433-9.
- 146 Reife RA, Shapiro RA, Bamber BA et al. (1995). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is poorly recognized by molecular components of innate host defense in a mouse model of early inflammation. *Infect Immun* 63: 4686-94.
- 147 Ricart-Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD (2002). Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxide* 6: 178-85.
- 148 Riche EL, Boggess KA, Lieff S et al. (2002). Periodontal disease increases the risk of preterm delivery among preeclamptic women. *Ann Periodontol* 7: 95-101.
- 149 Robinson EK, Kennison SD, Suliburk JW, Mercer DW (2005). Rat gastric injury after lipopolysaccharide: role of inducible nitric oxide synthase. *Surgery* 138: 523-9.
- 150 Sato EF, Utsumi K, Inoue M (1996). Human oral neutrophils: isolation and characterization. *Methods Enzymol* 268: 503-9.
- 151 Scannapieco FA (1999). Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 70: 793-802.
- 152 Scannapieco FA (2005). Systemic effects of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49: 533-50.
- 153 Sessa WC (2005). Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 15-8.
- 154 Shapira L, Ayalon S, Brenner T (2002). Effects of *Porphyromonas gingivalis* on the central nervous system: activation of glial cells and exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Periodontol* 73: 511-6.
- 155 Skalerič U, Gašpirc B, McCartney-Francis N, Masera A, Wahl SM (2006). Proinflammatory and antimicrobial nitric oxide in gingival fluid of diabetic patients with periodontal disease. *Infect Immun* 74: 7010-3.
- 156 Slots J, Kamma JJ (2001). General health risk of periodontal disease. *Int Dent J* 51: 417-27.
- 157 Sluyter F, Breivik T, Cools A (2002). Manipulations in maternal environment reverse periodontitis in genetically predisposed rats. *Clin Diagn Lab Immunol* 9: 931-2.

- 158 Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME (2000). Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 6: 875-81.
- 159 Sobrinho AP, Barros MH, Nicoli JR et al. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J Endod* 24: 405-8.
- 160 Sosroseno W (2000). Nitric oxide production by murine spleen cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis*-derived lipopolysaccharide. *Asian Pac J Allergy Immunol* 18: 209-14.
- 161 Sosroseno W, Bird PS, Gemmell E, Seymour GJ (2002). The role of CD4+ cells in vivo on the induction of the immune response to *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Periodontol* 73: 1133-40.
- 162 Sosroseno W, Herminajeng E (1995). The immunopathology of chronic inflammatory periodontal disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* 10: 171-80.
- 163 Srisatjaluk R, Kotwal GJ, Hunt LA, Justus DE (2002). Modulation of gamma interferon-induced major histocompatibility complex class II gene expression by *Porphyromonas gingivalis* membrane vesicles. *Infect Immun* 70: 1185-92.
- 164 Steffen MJ, Holt SC, Ebersole JL (2000). *Porphyromonas gingivalis* induction of mediator and cytokine secretion by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 15: 172-80.
- 165 Suliburk JW, Helmer KS, Kennison SD, Mercer DW, Robinson EK (2005). Time-dependent aggravation or attenuation of lipopolysaccharide-induced gastric injury by nitric oxide synthase inhibition. *J Surg Res* 129: 265-71.
- 166 Suzuki Y, Fujii S, Numagami Y et al. (1998). In vivo nitric oxide detection in the septic rat brain by electron paramagnetic resonance. *Free Radic Res* 28: 293-9.
- 167 Swartz HM (1972). Cells and tissues. In: Swartz HM, Bolton JR and Borg DC, eds. *Biological application of electron spin resonance*. New York: Wiley - Interscience, 155-95.
- 168 Swerdlow MP, Kennedy DR, Kennedy JS et al. (2006). Expression and function of TLR2, TLR4, and Nod2 in primary canine colonic epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 114: 313-9.
- 169 Šentjerc M, Štalc A (1976). Uporaba elektronske paramagnetne resonance v biologiji in medicini. *Med Razgl* 15: 259-79.
- 170 Takahashi N, Schachtele CF (1990). Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. *J Dent Res* 69: 1266-9.
- 171 Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H (2002). Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C762-7.
- 172 Taniguchi T, Yamamoto K (2005). Anti-inflammatory effects of intravenous anesthetics on endotoxemia. *Mini Rev Med Chem* 5: 241-5.
- 173 Teng YT (2003). The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 237-52.
- 174 Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE et al. (2001). Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* 49: 557-63.

- 175 Thippeswamy T, McKay JS, Quinn JP, Morris R (2006). Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad? *Histol Histopathol* 21: 445-58.
- 176 Tracey WR, Tse J, Carter G (1995). Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1011-5.
- 177 Tsikas D (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 39: 797-815.
- 178 Tsikas D, Fuchs I, Gutzki FM, Frolich JC (1998). Measurement of nitrite and nitrate in plasma, serum and urine of humans by high-performance liquid chromatography, the Griess assay, chemiluminescence and gas chromatography-mass spectrometry: interferences by biogenic amines and N(G)-nitro-L-arginine analogs. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 715: 441-4; discussion 445-8.
- 179 Tsutsumi Y, Kihira T, Yamamoto S et al. (1994). Chemical modification of natural human tumor necrosis factor-alpha with polyethylene glycol increases its anti-tumor potency. *Jpn J Cancer Res* 85: 9-12.
- 180 Ugar-Cankal D, Ozmeric N (2006). A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta* 366: 90-100.
- 181 Umeda JE, Missailidis C, Longo PL et al. (2006). Adhesion and invasion to epithelial cells by fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 21: 415-9.
- 182 Vanin AF, Huisman A, van Faassen EE (2002). Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: pitfalls and successes. *Methods Enzymol* 359: 27-42.
- 183 Vanin AF, Liu X, Samouilov A, Stukan RA, Zweier JL (2000). Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps of nitric oxide in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1474: 365-77.
- 184 Venkataraman S, Martin SM, Buettner GR (2002). Electron paramagnetic resonance for quantitation of nitric oxide in aqueous solutions. *Methods Enzymol* 359: 3-18.
- 185 Verthelyi D (2006). Female's heightened immune status: estrogen, T cells, and inducible nitric oxide synthase in the balance. *Endocrinology* 147: 659-61.
- 186 Veszelszky E, Holford NH, Thomsen LL, Knowles RG, Baguley BC (1995). Plasma nitrate clearance in mice: modeling of the systemic production of nitrate following the induction of nitric oxide synthesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 36: 155-9.
- 187 Voet D, Voet JG (1995). *Biochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1290-1.
- 188 Walsh LJ (2003). Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 188-98.
- 189 Wertz JE, Bolton J (1972). *Electron spin resonance: elementary theory and practical applications*. New York: McGraw - Hill, 21-37.
- 190 Wink DA, Grisham MB, Mitchell JB, Ford PC (1996). Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol* 268: 12-31.
- 191 Wishnok JS, Glogowski JA, Tannenbaum SR (1996). Quantitation of nitrate, nitrite, and nitrosating agents. *Methods Enzymol* 268: 130-41.
- 192 Wolf HF, Rateitschak EM, Rateitschak KH, Hassel TM (2005). *Color atlas of dental medicine: periodontology*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1-66.

193 Wray GM, Millar CG, Hinds CJ, Thiemeermann C (1998). Selective inhibition of the activity of inducible nitric oxide synthase prevents the circulatory failure, but not the organ injury/dysfunction, caused by endotoxin. *Shock* 9: 329-35.

194 Wu CC, Thiemeermann C (1996). Biological control and inhibition of induction of nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 268: 408-20.

195 Yakovlev M (2003). Elements of the endotoxin theory of human physiology and pathology. *Hum Physiol* 29: 476-85.

196 Yao D, Vlessidis AG, Evmiridis NP (2004). Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchim Acta* 147: 1-20.

197 Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM (2006). Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun* 74: 703-10.

198 Yoshino S, Sasatomi E, Mori Y, Sagai M (1999). Oral administration of lipopolysaccharide exacerbates collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 163: 3417-22.

11 PRILOGE

11.1 Vsebnost dušikovega oksida v organih miši in plazemska koncentracija nitrita/nitrata pri posameznih živalih, vključenih v študijo akutne okužbe s *P. gingivalis*

Tabela 3: Normirani rezultati meritev višine signala FeNO(DETC)₂ (vsebnosti NO) v organih miši in rezultati meritev plazemske koncentracije NO_x pri miših, vključenih v študijo akutne okužbe s *P. gingivalis*.

Skupina	NO (AU)							NO _x (μmol/l)
	pljuča	aorta	srce	jetra	vranica	ledvice	možgani	
I	0	0	0	...	0	0	0	17,6
I	0	0	0	0	0	0	0	19,2
I	0	0	0	0	0	0	0	13,4
II	2,88	0	0	0	0	0	0	...
II	3,48	19,5	...	3,5	0	0	0	...
II	1,56	0	0	0	0	0	0	...
II	10,21	6,8	3,65	30,88	2,91	8,14	5,93	16,4
II	5,42	17,05	2,17	5,09	0	2,98	1,81	16,8
II	1,89	7,8	0	0,47	0	1,69	0	20,8
II	9,9	...	5,14	26,04	1,88	5,19	11,07	16,4
II	6,08	5,15	1,49	9,99	0	4,64	2,24	20,8
III (2,5h)	1,44	0	0	0,94	0	0	0	13,2
III (2,5h)	8,7	13,7	1,45	8,2	1,34	1,94	1,62	17,9
III (2,5h)	1,32	5	0	1,42	0	1,6	0	12,4
III (7h)	1,38	3,28	0	0,78	0	0	0	10,8
III (7h)	2,45	4,11	0	1,87	0	1,21	0,89	13,6
III (7h)	4,99	0	0	18,76	0	0,9	3,07	7,2
III (13h)	8,7	14,57	8,08	16,74	0	2,19	2,05	14,4
III (13h)	3,76	7,43	0,06	1,02	0	0,33	0	14
III (13h)	2,35	9,95	0	0,16	0	0,33	...	13,2
III (25h)	4,51	4,73	0,62	2,68	0	1,58	1,47	20,4
III (25h)	3,32	6,14	0,07	0,43	0	1,96	0,4	15,5
III (25h)	2,95	7,56	0	0,95	0	1,05	0,85	12,4
III (25h)	1,64	4,1	0,24	0,12	0	0,49	0,32	12,8
III (25h)	1,97	7,7	0	0,05	0	0,43	0,43	11,2
III (25h)	2,39	4,75	0,56	0,12	0	0	0	12,8
III (25h)	6,72	0	3,6	26,76	2,52	5,59	6,75	...
III (25h)	8,52	2,63	3,62	30,36	2,88	5,21	5,41	...
III (25h)	2,07	8,95	0	0,83	0	1,16	0,5	...

11.2 Vsebnost dušikovega oksida v organih miši, plazemska koncentracija nitrita/nitrata in TNF- α ter imunohistokemijska analiza ledvic pri posameznih živalih, vključenih v študijo kronične okužbe s *P. gingivalis*

Tabela 4: Normirani rezultati meritev višine signala FeNO(DETC)₂ (vsebnosti NO) v organih in rezultati meritev plazemske koncentracije NO_x in TNF- α ter rezultati imunohistološke analize ledvic (0 – iNOS v ledvici ni prisotna, 1 – imunohistokemijsko zaznana prisotnost iNOS v ledvici) pri miših, vključenih v študijo kronične okužbe s *P. gingivalis*.

Skupina	NO (AU)							NO _x (μ mol/l)	TNF- α (ng/l)	iNOS		
	pljuča	aorta	srce	jetra	vranica	ledvice	možgani			ledvična skorja	ledvična sredica	ledvična papila
1	0	0	0	...	0	0	0	17,6	...	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	19,2	...	1	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	13,4	...	1	1	0
2	2,88	0	0	0	0	0	0
2	3,48	19,5	...	3,5	0	0	0
2	1,56	0	0	0	0	0	0
2	10,21	6,8	3,65	30,88	2,91	8,14	5,93	16,4	...	1	1	0
2	5,42	17,05	2,17	5,09	0	2,98	1,81	16,8	...	1	1	1
2	1,89	7,8	0	0,47	0	1,69	0	20,8	...	1	1	0
2	9,9	...	5,14	26,04	1,88	5,19	11,07	16,4	...	1	1	0
2	6,08	5,15	1,49	9,99	0	4,64	2,24	20,8	...	1	1	0
3	0	2,57	0	0	0	0	0	15,2	< 0,1	1	1	0
3	1,39	5,7	0	0	0	0	0	11,5	< 0,1	1	1	1
3	2,94	9,8	0,71	6,6	1,11	2,25	3,2	12,4	4,0	1	1	0
3	2,24	3,33	0	0,31	0,89	0,88	0,95	11,2	< 0,1	0	0	0
3	0	4,13	0	0	0	0	0	12,6	< 0,1	0	0	0

A. Nemeč: Vpliv peroralne okužbe z bakterijo *Porphyromonas gingivalis* na sistemsko raven dušikovega oksida pri miših

Skupina	NO (AU)							NO _x (μmol/l)	TNF-α (ng/l)	iNOS		
	pljuča	aorta	srce	jetra	vranica	ledvice	možgani			ledvična skorja	ledvična sredica	ledvična papila
4	4,86	0	1,58	8,83	0,36	3,82	3,1	27,9	...	1	1	0
4	4,07	5,25	0,76	6,74	0,63	1,92	1,3	27,4	...	1	1	0
4	1,69	1,98	0	0,09	0	0,33	0,15	17,5	...	1	1	0
4	4,84	3,88	1,09	7,13	0,75	2,31	4,43	20	...	1	1	0
4	7,46	7,63	0,33	3,65	0,58	2,8	2,52	29,5	...	1	1	0
5	2,35	3,93	0,24	4,46	0	0,6	2,77	16	...	1	1	1
5	6,48	13,6	1,02	16,2	0,88	2,21	4,12	16,4	...	1	1	1
5	1,2	5,85	0	0,89	0	0,59	0	17,4	...	1	1	0
5	3,94	6,35	0,72	7,11	0	1,38	2,77	18,8	...	0	0	0
5	0,08	6,35	0	0,77	0	0,55	0,89	15,6	...	1	1	1
5	0	4,55	0	0,15	0	0,25	...	18,4	...	1	1	0
6	17,02	14,2	7,74	76,35	3,43	5,59	10,52	18	6,9	1	1	1
6	1,82	2,88	0	0,62	0	0,48	0	14,8	...	1	1	0
6	1,98	4,27	0	1,62	0,6	1,63	1,61	12	< 0,1	1	1	0
6	9,45	9,58	1,91	27,43	1,42	5,34	6,43	19,6	8,2	1	1	...
6	7,15	6,3	0,89	10,53	0	3,18	3,52	23,8	5,3	1	1	0
6	1,31	3,8	0	0,32	0	0,94	0	31,2	< 0,1	1	1	0
7	4,08	1,5	0,44	12,61	0	4,95	0	23,6	...	1	1	0
7	5,18	8,85	1,45	6,71	0,93	3,03	1,06	22,1	...	1	1	0
7	2,27	...	0,5	0,76	0,96	0,27	0,62	21,6	...	1	1	...
7	6,54	7,6	0,84	4,4	0,74	3,34	1,88	34,8	...	1	1	0
7	2,49	7,55	0	1,08	0,06	1,57	0	21,2	...	1	1	0
8	5,89	0	1,45	10,51	1,59	0,93	4,28	14,6	...	0	0	0

A. Nemeč: Vpliv peroralne okužbe z bakterijo *Porphyromonas gingivalis* na sistemsko raven dušikovega oksida pri miših

Skupina	NO (AU)							NO _x (μmol/l)	TNF-α (ng/l)	iNOS		
	pljuča	aorta	srce	jetra	vranica	ledvice	možgani			ledvična skorja	ledvična sredica	ledvična papila
8	1,58	0	0,23	0,56	0,6	0,62	1,02	17,2	...	0	0	0
8	1,81	0	0	0,46	0	0,58	0,83	15,2	...	1	1	1
8	4,35	0	0,85	6,68	0,83	2,63	3,97	19,6	...	1	1	0
8	0,48	0	0	0,31	0	0,82	0	18,4	...	1	1	0
8	1,18	6,13	0	0,18	0	0,17	0	16,4	...	1	1	0

