

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Kanabidiol v zubním lékařství**

Disertační práce

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a veškerou použitou literaturu řádně citoval a uvedl.

V Olomouci dne 30.11.2022

.....

MDDr. Petr Jirásek

Děkuji své školitelce MDDr. Ivě Voborné, Ph.D. za dlouholeté odborné vedení a podporu, prof. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. FRSC za veškeré podnětné připomínky během výzkumu a prof. RNDr. MUDr. Vilímu Šimánkovi, DrSc za dlouholetou podporu a zpětnou vazbu. Dále děkuji prof. MUDr. Filipu Růžičkovi, Ph.D. a Danielu Diabelkovi za provedení mikrobiologické analýzy, Mgr. Kateřině Langové, Ph.D. za statistické zpracování dat a MUDr. Mgr. Markétě Kolečkové, Ph.D. za histopatologickou analýzu. Svě rodině a manželce děkuji za trpělivost a porozumění v průběhu celého studia.

## Abstrakt

### Úvod

Parodontitis je zánětlivé onemocnění charakterizované ztrátou attachmentu, které postihuje 20–50 % světové populace, a je považováno za jednu z nejčastějších příčin ztráty zubů. Vznik a progresse zánětu nejsou spojeny pouze s imunitní reakcí měkkých tkání, ale také s rovnováhou mezi komenzálními a patogenními bakteriemi, které společně představují orální mikrobiom. Na základě uvedeného jsou hledána nová nízkomolekulární terapeutika splňující tři kritéria, a to protizánětlivý a antibakteriální účinek a vhodný bezpečnostní profil. Jednou z aktuálně studovaných skupin látek, které mohou splňovat výše uvedená tři kritéria jsou nepsychotropní fytoKANABINOIDY, především KANABIDIOL (CBD).

### Metody

Byla provedena literární rešerše pomocí databází PubMed, Scopus a Web of Science. V disertační práci jsem nejprve preklinicky hodnotil antimikrobiální účinky (MIC: minimální inhibiční koncentrace) fytoKANABINOIDŮ *in vitro* na vybrané druhy orálních patogenů pomocí standardní mikrodiluční techniky. V klinické části byla provedena placebem kontrolovaná dvojité zaslepená studie u pacientů s chronickou parodontózou (muži a ženy ve věku 35–65 let s počtem vlastních zubů  $\geq 16$ ). Pacienti byli rekrutováni monocentricky ve třech skupinách a užívali bez omezení na denní bázi po dobu 56 dní experimentální zubní pastu a dentální gel bez obsahu CBD (skupina A,  $n = 30$ ) a s obsahem 1 % (w/w) CBD (skupina B,  $n = 30$ ). Třetí skupina (aktivní komparátor) užívala zubní pastu bez obsahu CBD a byla ošetřena dostupným preparátem Corsodyl s obsahem 1 % chlorhexidin diglukonátu (skupina C,  $n = 30$ ). Studie byla provedena na základě souhlasu Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc (číslo jednací: 36/20) a registrovaná v mezinárodní databázi ClinicalTrials.gov pod identifikátorem (NCT05498012).

### Výsledky

Na základě literárního šetření byly kriticky hodnoceny možnosti využití fytoKANABINOIDŮ v zubním lékařství. V rámci preklinických sledování CBD vykazoval antimikrobiální aktivity u *P. gingivalis* (MIC 1,5  $\mu\text{g/ml}$ ) a *S. mutans* (MIC 16  $\mu\text{g/ml}$ ). U *P. gingivalis*, *L. casei* a *L. acidophilus* se hodnoty MIC KANABINOIDŮ blížily hodnotám MIC chlorhexidinu. U ostatních mikrobů byla účinnost KANABINOIDŮ v porovnání s chlorhexidinem nižší. V klinické části byly hodnoceny hygienické a parodontální indexy. Statisticky signifikantní změny mezi 0 a 56 dnem byly pozorovány pro GI (Gingival Index), GBI (Gingival Bleeding Index) a MGI (Modified

Gingival Index) mezi skupinou A a B na hladině významnosti  $p < 0,0001$ . Skupina C vykazovala podobné výsledky jako skupina A. Zlepšení hodnocených indexů ve skupině B se pohybovalo mezi 20–45 %. V průběhu studie byly také odebírány histopatologické vzorky gingivální tkáně pro jednoznačné potvrzení diagnózy zánětu a byly odebírány mikrobiologické vzorky pro semikvantitativní hodnocení přítomnosti hlavních periopatogenů. Pomocí 16S rDNA screeningu byly pozorovány klesající trendy v počtu periopatogenních bakterií, a to především *P. gingivalis* pro skupinu B, nikoliv pro skupiny A a C.

### **Závěr**

Preklinické výsledky potvrzují antimikrobiální působení, především CBD, na vybrané orální patogeny a mohou být využity pro další (pre)klinické hodnocení. Na základě těchto výsledků jsme provedli klinické testování, které prokázalo statisticky významné zlepšení hygienických a parodontálních indexů po aplikaci CBD (skupina B) ve srovnání se skupinami A a C. Výsledky taktéž naznačují, že CBD bude schopen vhodně modulovat orální mikrobiom, a to především inhibicí růstu anaerobních periopatogenních bakterií jako je *P. gingivalis*. Získané výsledky mohou být využity pro aplikaci CBD a dalších nepsychotropních fytoKANABINOIDŮ v zubním lékařství.

## Abstract

### Background

Periodontitis is an inflammatory disease characterized by the loss of clinical attachment that affects 20–50 % of the world's population and is considered one of the most common causes of tooth loss. The emergence and progression of inflammation is not only associated with the immune response of gingival tissue, but also with the balance in commensal and pathogenic bacteria representing oral microbiome. In this sense, new low-molecular therapeutics are being sought that meet three criteria, namely anti-inflammatory and antibacterial effects with an acceptable safety profile. One of the currently studied groups of substances that can meet those criteria are non-psychotropic phytocannabinoids, especially cannabidiol (CBD).

### Methods

Peer-reviewed publications concerning the use of CBD in dentistry were searched in three international databases PubMed, Scopus, and Web of Science. At first, we preclinically evaluated the antimicrobial effects (MIC, minimum inhibitory concentration) of phytocannabinoids *in vitro* on selected oral pathogens by the standard microdilution technique. In the clinical part, placebo-controlled double-blind randomized trial with chronic periodontitis patients (men and women, age 35–65, number of natural teeth  $\geq 16$ ) was conducted monocentrically in three groups, which used an experimental toothpaste and dental gel without CBD (placebo group A,  $n = 30$ ) and with 1 % (w/w) CBD (group B,  $n = 30$ ). Group C (as active comparator,  $n = 30$ ) used placebo toothpaste without CBD and was treated with dental gel Corsodyl containing 1 % chlorhexidine digluconate. The study design was based on the approval of the Ethical committee of Olomouc University Hospital (Approval Number: 36/20) and registered at ClinicalTrials.gov (NCT05498012).

### Results

Possibilities of the use of phytocannabinoids in dentistry were critically evaluated based on a literature review. As part of preclinical studies CBD showed antimicrobial activities against *P. gingivalis* (MIC 1.5  $\mu\text{g/mL}$ ) and *S. mutans* (MIC 16  $\mu\text{g/mL}$ ). For *P. gingivalis*, *L. casei* and *L. acidophilus*, the MIC values of cannabinoids were close to those of chlorhexidine. For other microbes, the efficacy of cannabinoids was lower compared to chlorhexidine. Oral hygiene and periodontal indices were evaluated in the clinical part. Statistically significant changes between 0 and 56 days were observed for GI (Gingival Index), GBI (Gingival Bleeding Index) and MGI (Modified Gingival Index) between group A and B at a significance level of  $p < 0.0001$ . Group

C showed similar results as group A. The improvement in the evaluated indices in group B ranged between 20–45 %. Histopathological samples of gingival tissue were collected to clearly confirm the diagnosis of inflammation, and microbiological samples of gingival crevicular fluid were collected for semi-quantitative assessment of the presence of the main periodontopathogens. Using 16S rDNA screening, declining trends were observed in the count of periodontal pathogenic bacteria, especially *P. gingivalis* for group B, but not for groups A and C.

### **Conclusions**

Preclinical results confirm the antimicrobial effect, especially of CBD, on selected oral pathogens and can be used for further (pre)clinical evaluation. Based on these results, we performed clinical trial that demonstrated a statistically significant improvement in hygiene and periodontal indices after CBD application (group B) compared to the groups A and C. The results also indicate that CBD will be able to modulate the oral microbiome, primarily by inhibiting the growth of anaerobic periodontal pathogenic bacteria such as *P. gingivalis*. The obtained results can be used for further applications of CBD and other non-psychoactive phytocannabinoids in dental practice.

## Obsah

### TEORETICKÁ ČÁST

1) Kanabinoidy.....	11
1.1. Historie konopí.....	11
1.1.1. Problematika konopí v České republice.....	14
1.2. Fytochemie konopí.....	15
1.3. Nepsychotropní fytoKANabinoidy.....	16
1.4. Farmakologie CBD.....	17
1.5. Metabolismus CBD.....	18
1.6. Endokanabinoidní systém.....	19
1.7. Účinky fytoKANabinoidů.....	19
1.7.1. Vliv fytoKANabinoidů na tkáň parodontu.....	19
1.7.2. Antioxidační účinky.....	20
1.7.3. Vliv CBD na ekologii orální mikroflóry.....	21
2) Onemocnění parodontu.....	22
2.1. Ekonomické aspekty onemocnění dutiny ústní.....	22
2.2. Parodontitis chronica.....	22
2.2.1. Epidemiologie.....	22
2.2.2. Etiologie.....	23
2.2.3. Klasifikace.....	25
2.2.4. Kouření jako rizikový faktor vzniku parodontitis.....	30
2.2.5. Vztah orálního mikrobiomu k celkovým onemocněním.....	32
2.2.6. Chemoprolaxe gingivy.....	33
2.2.6.1. Tvorba biofilmu.....	33
2.2.6.2. Prostředky ústní hygieny.....	33
2.2.7. Terapie parodontitis.....	35
2.2.7.1. Vliv CBD na tvorbu prozánětlivých cytokinů.....	36
2.2.7.2. Pilotní klinické studie o účinku CBD na chronický zánět a regeneraci parodontu.....	38
2.2.8. CBD a jeho anxiolytické účinky.....	39
2.2.9. Kritické posouzení.....	40



## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3) Preklinická studie.....	42
3.1. Metodika.....	42
4) Klinická studie.....	47
4.1. Design klinické studie.....	47
4.1.1. Studovaná populace.....	49
4.1.2. Vstupní kritéria.....	49
4.1.3. Vylučovací kritéria.....	49
4.1.4. Odhad velikosti vzorku.....	49
4.1.5. Randomizace, sběr a zpracování dat.....	50
4.1.6. Složení dentálních gelů a past.....	51
4.1.7. Primární a sekundární cíle studie.....	51
4.1.8. Léčebný protokol.....	52
4.1.9. Statistická analýza.....	57
4.2. Výsledky.....	58
4.2.1. Preklinická část.....	58
4.2.2. Klinická část.....	60
5) Souhrn poznatků disertační práce.....	68
6) Seznam zkratk.....	69
7) Seznam obrázků.....	71
8) Seznam tabulek.....	72
9) Seznam grafů.....	73
10) Seznam odborných publikací autora.....	74
11) Literatura.....	76

**Cílem teoretické části** bylo shrnout základní poznatky z odborné literatury o fytoKANABINOIDECH, především pak o KANABIDIOLU, jeho vlastnostech a možnostech využití v zubním lékařství, a to především se zaměřením na léčbu onemocnění parodontu.

**Cílem experimentální preklinické části** bylo zjistit a porovnat:

Minimální inhibiční koncentraci CBC, CBD, CBN, CBG a CHX u *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* a minimální inhibiční koncentraci CBD a CHX u *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*.

**Primárním cílem klinické části** bylo prověřit:

1. účinek CBD na změnu hodnot plakového indexu (PLI) u pacientů s diagnózou parodontitis chronica.
2. účinek CBD na změnu hodnot gingiválního indexu (GI) u pacientů s diagnózou parodontitis chronica.
3. účinek CBD na změnu hodnot modifikovaného gingiválního indexu (MGI) u pacientů s diagnózou parodontitis chronica.
4. účinek CBD na změnu hodnot indexu krvácivosti gingivy (GBI) u pacientů s diagnózou parodontitis chronica.
5. účinek CBD na změnu hodnot Russelova parodontálního index (PI) u pacientů s diagnózou parodontitis chronica.

**Sekundárním cílem** bylo hodnotit antimikrobiální působení CBD na vybrané periopatogenní bakterie (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* sp.).

## TEORETICKÁ ČÁST

### 1. *Kanabinoidy*

#### 1.1. *Historie konopí*

*Cannabis sativa* L. (konopí) je dvoudomá jednoletá kvetoucí rostlina s všestrannými možnostmi využití jejich jednotlivých částí, a to jako zdroje potravy (semena), tkanin (stonky) a farmakologicky účinných látek (neoplozené samičí květy) [2]. Druhovému zařazení konopí je připisováno Carlu Linnému, který ho popsal ve své systematizaci botanických binomů - *Species Plantarum* (Rostlinné druhy) [3]. Pěstování a užívání konopí se datuje 5 až 6 tisíc let do minulosti [4]. Historicky byly jako potencionální regiony pro přírodní původ anebo primární domestikaci konopí považovány střední a jihovýchodní Asie [4]. Konopí se pro léčebné účely využívalo ve starověké Číně [5], Asýrii [6] a v Egyptě [7]. Vůbec zatím nejstarším doloženým využitím a pěstováním konopí pro medicínské a náboženské účely je nález 2700 let staré hrobky Yanghai (poblíž města Turpan, v autonomním regionu Xinjiang-Uighur, Čína) v hrobu šamana, ve které bylo uloženo 789 gramů konopí s vysokým obsahem  $\Delta$ -9-trans-tetrahydrokanabinolu ( $\Delta^9$ -THC) a dalších fytoKANABINOIDŮ včetně kanabidiolu (CBD) [8].

V moderní historii došlo k rozšíření konopí na většinu kontinentů. Během koloniální éry byly do severní Ameriky importovány hlavně odrůdy vhodné pro textilní výrobu. Stejně tak prodej konopí v Evropě během novověku byly určeny výhradně pro průmyslový obchod [9].

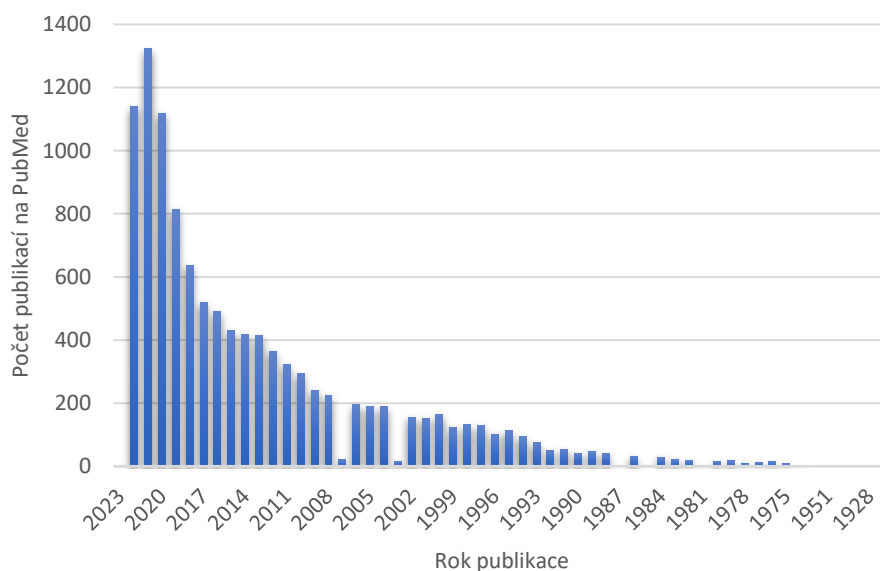
Jedním z důkazů o vstupu konopí do moderní éry západní civilizace je práce francouzského lékaře Jacquese-Josepha Moreaua - *Du Hachisch et de l'aliénation mentale* (Hašiš a duševní choroba, 1845). Předpokládal, že pocity vyvolané konopím mohou způsobovat halucinace a bludy běžné u jedinců s psychotickými stavy. Doufal, že tento výzkum pomůže při léčbě mentálně nemocných [10]. Moreauovi s jeho prací pomáhal populární romanopisec Pierre Gautier. Ten se nejen přímo účastnil výzkumu, ale i rekrutoval členy francouzské umělecké komunity včetně Charlese Pierra Baudelaira, Honore' de Balzaca, Alexandra Dumase a Gustava Flauberta, členy Club Des Hashichins (Hašišový klub) [11].

Konopí, které se během 19. a začátku 20. stol. v USA používalo jako volně prodejný léčivý přípravek (patent medicine), bylo poprvé popsáno v americkém lékopise v roce 1850. V Anglii se konopí v 19. stol. využívalo pro své analgetické, protizánětlivé, antiemetické a antikonzulzivní účinky [12]. I přes výše zmíněné pozitivní vlastnosti bylo cílem různých zákazů a omezení. V roce 1932 bylo díky svým psychoaktivním účinkům odebráno z Britského lékopisu [13]. V USA v roce 1937 snaha o federální omezení užívání a prodeje konopí vyústila

ve schválení „the Marihuana Tax Act“, zákona o zdanění marihuany, který dával za povinnost všem lékařům, obchodníkům a pěstitelům provádět evidenci a platit daně z konopí. Tento krok vedl k postupnému odstranění konopí z lékopisů napříč světem [14]. Navzdory těmto omezením se *C. sativa* i nadále využívala v tradiční medicíně, stejně tak pokračoval intenzivní farmakologický výzkum a sociokulturní diskuse na toto téma [15]. Jedním z takových příkladů je práce Krejčího, který v roce 1950 popsal antibiotické účinky konopí a začal ho klinicky využívat [16, 17]. Konopí, které bylo v této době pěstováno v Československu, bylo například využíváno při léčbě pacientů ve Fakultní nemocnici Olomouc [18]. Tehdejší československý výzkum týkající se konopí vyvrcholil v roce 1954, kdy se v Olomouci konala první vědecká konference na téma „Konopí jako lék“ [19].

Z farmakologického hlediska byl první úspěšný pokus o identifikaci typické složky konopí proveden Woodem *et al.*, který izoloval kanabinol z konopné pryskyřice *C. indica* (charas) [20]. O několik let později Todd (UK) [21] a Adams (USA) [22] nezávisle na sobě syntetizovali několik isomerů kanabinolu, srovnali je s přírodním kanabinolem, a v jednom případě dosáhli shody, čímž došlo k objasnění struktury prvního kanabinoidu. Druhou izolovanou složkou konopí byl v roce 1940 nepsychotropní kanabidiol, jeho struktura byla však objasněna pouze částečně [22]. Krejčí a Šantavý následně identifikovali složku konopí s antibiotickým účinkem proti grampozitivním bakteriím, a některým dalším patogenům, tuto látku pojmenovali kyselinou kanabidiolovou [23-25]. V roce 1963 skupina kolem profesora Mechoulama znovu izolovala kanabidiol a popsala jeho strukturu a stereochemii [26]. O rok později stejná skupina izolovala čisté THC ( $\Delta^9$ -THC), objasnila jeho strukturu, získala jeho krystalickou formu a dosáhla jeho částečné syntézy z kanabidiolu [27]. V roce 1964 ke správné struktuře THC nezávisle na skupině profesora Mechoulama došel i Šantavý, a to pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie [28].

V posledních čtyřech desetiletích výrazně vzrostl zájem o problematiku fytkanabinoidů. Tento trend můžeme sledovat na počtu publikací v databázi PubMed v průběhu let (viz. Graf 1).



**Graf 1: Počet publikací s heslem CBD v databázi PubMed.**

CBD je jediným izolovaným fytkanabinoidem, který byl pro své antikonvulzivní účinky zkoumán, jak v preklinických studiích na zvířatech, tak i klinických studiích na lidech. Velmi raný výzkum v 70. a 80. letech odhalil, že perorálně podávané CBD (ve vysokých dávkách) může zmírňovat záchvaty u pacientů trpících epilepsií [29, 30]. Tento typ léčby (Epidiolex®), vykazující významné snížení frekvence záchvatů ve srovnání s placebem v několika studiích, byl v roce 2018 schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a následně i Evropskou lékovou agenturou (EMA) pro pacienty se vzácnými formami dětské epilepsie – syndromem Dravetové a Lennox-Gastautovým syndromem [31, 32]. Dalším léčivým přípravkem s obsahem CBD je Sativex. Jedná se o konopný extrakt ve formě orálního spreje k sublingvální aplikaci. Jeden vstřík spreje obsahuje 2,7 mg THC a 2,5 mg CBD. V roce 2010 došlo ve Spojeném království ke schválení tohoto přípravku, a to v rámci následujících indikací: zmírnění neuropatické bolesti a spasticity u roztroušené sklerózy. Sativex je registrován pro použití i v České republice.

### 1.1.1. Problematika konopí v České republice

V českém právním řádu je konopí pro léčebné použití indikováno jako podpůrná či doplňková léčba ke zmírnění symptomů doprovázejících závažná onemocnění (Obr. 1). Jedná se o sušené samičí květy rostliny *Cannabis sativa* L. nebo *Cannabis indica* L. Konopí pro léčebné použití obsahuje velké množství účinných složek, mezi nejvýznamnější patří THC a CBD. Obsah účinných látek se může pohybovat od 0,3 % do 21 % u THC a od 0,1 % do 19 % u CBD. Konopí je regulováno zejména zákonem o návykových látkách (167/1998 Sb.) a vyhláškou o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití (236/2015 Sb.) [33]. CBD dle českého právního systému nepatří mezi omamné a psychoaktivní látky.

Indikace	Specializovaná způsobilost lékaře
chronická neutišitelná bolest (zejména bolest v souvislosti s onkologickým onemocněním, bolest spojená s degenerativním onemocněním pohybového systému, systémovým onemocněním pojiva a imunopatologickými stavy, neuropatická bolest, bolest při glaukomu)	klinická onkologie radiační onkologie neurologie paliativní medicína léčba bolesti revmatologie ortopedie infekční lékařství vnitřní lékařství oftalmologie dermatovenerologie geriatrie
spasticita a s ní spojená bolest u roztroušené sklerózy nebo při poranění míchy, nebolestivá úporná spasticita zásadním způsobem omezující pohyb a mobilitu, nebo dýchání pacienta, mimovolné kinézy způsobené neurologickým onemocněním a další zdravotní komplikace, mající původ v neurologickém onemocnění, nebo úrazu páteře s poškozením míchy, či úrazu mozku, neurologický třes způsobený Parkinsonovou chorobou a další neurologické potíže dle zvážení ošetřujícího lékaře	neurologie geriatrie
nauzea, zvracení, stimulace apetitu v souvislosti s léčbou onkologického onemocnění nebo s léčbou onemocnění HIV	klinická onkologie radiační onkologie infekční lékařství dermatovenerologie geriatrie
Gilles de la Tourette syndrom	psychiatrie
povrchová léčba dermatóz a slizničních lézí	infekční lékařství dermatovenerologie geriatrie

**Obr. 1: Indikační kritéria pro preskripci léčebného konopí v ČR.** Převzato ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv. 2022 [citováno 2022 18.11.2022]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/konopi-pro-lecebne-pouziti>. [33]

## 1.2. Fytochemie konopí

Předpokládalo se, že jedinými aktivními sloučeninami v konopí jsou kanabinoidy, v posledních letech však vědci začali spekulovat o synergistickém anebo tzv. entourage efektu dalších složek konopí. Mezi tyto složky řadíme terpeny a terpenoidy. Termín entourage efekt zavedl v roce 1988 Mechoulam *et al.* [34], popsal ho jako zvýšenou aktivitu účinné složky se složkou neaktivní. Přibývají důkazy, že tyto složky společně účinkují lépe než samostatně, což naplňuje definici termínu entourage efekt. Konkrétně se jednalo o situaci, kdy různé „neaktivní“ metabolity a blízké příbuzné molekuly výrazně zvýšili aktivitu primárních endogenních kanabinoidů – anandaminu a 2-arachidonoylglycerolu [35]. Za posledních několik desetiletí bylo v *C. sativa* identifikováno 565 látek (Tab.1), z toho 120 fytokanabinoidů (11 základních skupin:  $\Delta^9$ -THC, (-)- $\Delta^8$ -trans-tetrahydrokanabinol ( $\Delta^8$ -THC), kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), kanabinodiol (CBND), kanabielsoin (CBE), kanabicyclol (CBL), kanabinol (CBN), kanabitriol (CBT) a smíšené typy). Mezi další látky obsažené *C. sativa* řadíme 120 terpenů, což jsou aromatické oleje odpovědné za typickou vůni konopí [36]. Je vysoce pravděpodobné, že prvním izolovaným terpenem byl  $\beta$ -karyofylen, který byl identifikován jako agonista CB2 receptorů [19].

Chemická třída	2005	2015
$\Delta^9$ -THC typ	9	23
$\Delta^8$ -THC typ	2	5
CBG typ	8	16
CBC typ	6	9
CBD typ	7	7
CBND typ	2	2
CBE typ	5	5
CBL typ	3	3
CBN typ	7	11
CBT typ	9	9
Smíšené typy	14	30
<b>Celkově kanabinoidů</b>	<b>72</b>	<b>120</b>
Celkově nekanabinoidů	419	445
<b>Celkem</b>	<b>491</b>	<b>565</b>

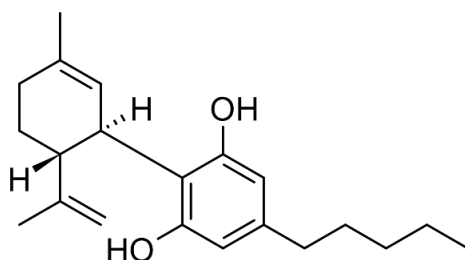
**Tab. 1: Dělení fytokanabinoidů do chemických tříd.** Převzato z: ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. Prog Chem Org Nat Prod. 2017;103:1-36.[37]

### 1.3. Nepsychotropní fytoKANABINOIDY

**Kanabigerol** (CBG) patří mezi nepsychotropní kanabinoidy, vykazuje celou řadu terapeutických vlastností (antibakteriální, antimykotické, protizánětlivé a neuromodulační účinky), a to díky své interakci s receptory spřaženými s G-proteiny [38]. CBG snižuje transkripční aktivitu NFκB (nuclear factor κB), odpovědného za transkripci prozánětlivých cytokinů [39], čímž dochází ke snižování hladin TNFα (tumor necrosis factor α) a interleukinu 1β (IL-1β) [40]. CBG vykazuje antioxidační vlastnosti díky modulaci exprese superoxid dismutasy 1 [40]. CBG v současnosti patří mezi nejméně prozkoumané kanabinoidy. Dosud nebyl zjištěn žádný škodlivý účinek CBG na lidský organismus. Prokázaná biologická aktivita ukazuje CBG a jeho deriváty jako velmi slibné přírodní sloučeniny, které by měly být důkladně testovány *in vitro* i *in vivo*, aby bylo možné jednoznačně určit jejich terapeutickou užitečnost, zejména s ohledem na zánětlivá onemocnění [38].

**Kanabichromen** (CBC) má nízkou vazebnou afinitu ke kanabinoidním receptorům typu 1 (CB1), nicméně na tomto receptoru odpovědném za psychotropní účinky THC nevykazuje žádnou znatelnou aktivitu [41]. CBC je však účinnější agonista kanabinoidního receptoru typu 2 (CB2) než THC, což naznačuje, že CBC může být účinnou protizánětlivou látkou [42]. Ve studiích na hlodavcích vykazoval CBC antimikrobiální, protizánětlivé, analgetické a antidepresivní účinky [43]. Praktická aplikace CBC je, vzhledem k jeho nestabilitě, nepravděpodobná.

**Kanabidiol** (CBD) (Obr. 2) řadíme do skupiny nepsychotropních kanabinoidů. CBD je krystalická sloučenina s bodem tání 66 °C až 67 °C [44]. V nejvyšší koncentraci je produkován v neoplozených samičích květenstvích v glandulárních trichomech (Obr. 3). Trichomy produkují pryskyřici, která je zdrojem mnoha účinných látek [45]. CBD působí pleiotropně a bifazicky v závislosti na podané dávce. Pleiotropní účinky CBD mohou být dány tím, že jeho molekula je složena ze dvou strukturních motivů přírodních látek, cyklického monoterpenu a 5-pentenylresorcinolu [46, 47].



**Obr. 2: Chemická struktura kanabidiolu.**





**Obr. 3: Produkce konopné pryskyřice.** Převzato z Russo EB. Cannabidiol Claims and Misconceptions. Trends Pharmacol Sci. 2017;38(3):198-201. [45]

Dle aktuálních informací je v databázi ClinicalTrials.gov registrováno 419 plánovaných, probíhajících a ukončených klinických studií s CBD. Většina CBD studií je zaměřena na studium jeho neuroprotektivních, antiepileptických, anxiolytických, antipsychotických a protizánětlivých účinků [48]. O biologické aktivitě a potenciální aplikaci CBD, ale i dalších sekundárních metabolitů rodu *Cannabis*, v zubním lékařství recentně pojednává práce Loweho *et al.* [49] a David *et al.* [50].

#### **1.4. Farmakologie CBD**

CBD se na dnešním trhu, mimo jiné, vyskytuje ve formě volně prodejných doplňků stravy (CBD kapsle, oleje). Tyto produkty na bázi komplexního extraktu z konopí se často potýkají s problémem nepřesného označení obsahu účinných látek. Bonn-Miller *et al.* zjistili, že u 69 % produktů označených jako „čisté CBD“ neodpovídalo deklarované množství účinné látky (43 % obsahovalo nižší množství CBD, 26 % vyšší množství CBD a 21 % obsahovalo THC [až 6,4 mg/l]) [51].

Úspěšná distribuce aktivní látky do cílových míst účinku závisí na mnoha faktorech včetně fyziologie jednotlivce a fyzikálně-chemických vlastností (rozpuštěnost, stabilita, permeabilita a metabolismus). Nízká biologická dostupnost, která je závislá na těchto faktorech, obecně vede k nedostatečné terapeutické účinnosti a pravděpodobněji způsobí vysokou interindividuální variabilitu farmakokinetických parametrů [52]. V tomto kontextu se biologická dostupnost CBD výrazně liší podle cesty a způsobu podání.

Kouření/vaporizování vykazuje biologickou dostupnost přibližně 31 % [53]. Kosmetické přípravky ve formě balzámů, krémů, gelů, mastí a náplastí patří v dnešní době mezi vysoce populární produkty. V současnosti pro ně ale nejsou k dispozici žádná data z kontrolovaných klinických studií, která by hodnotila farmakokinetický profil, behaviorální účinky a charakteristiku použití [54]. Protože CBD je lipofilní, hromadí se ve vnější vrstvě kůže (stratum corneum) a neproniká přes další vrstvy [55]. U perorálně podaných přípravků se informace o

biologické dostupnosti pohybují v rozmezí 6 % [52] až k hodnotám mezi 13–19 % [56]. Vzhledem ke své lipofilitě, vykazuje CBD u uživatele nízkou biologickou dostupnost ve stavu na lačno, nicméně po jídle (s vyšším obsahem tuků) se biologická dostupnost zvyšuje [57].

### ***1.5. Metabolismus CBD***

CBD se intenzivně metabolizuje v játrech pomocí cytochromu P450 (CYP), největším podílem jeho dvěma formami CYP3A4 and CYP2C19, které jsou zodpovědné za metabolismus různých klinicky důležitých léčiv. Je tedy třeba brát v potaz hypotetické riziko lékových interakcí [58]. Debatu o metabolismu CBD a jeho transformaci na  $\Delta^9$ -THC a  $\Delta^8$ -THC po prolongované expozici „simulované“ žaludeční kyselině vyvolala recentní *in vitro* studie od Merricka *et al.* [59]. Přestože je tato izomerizace známa po desetiletí [22, 26], neprokázalo se, že k ní dochází *in vivo* u lidí [60]. Za prvé, neexistuje žádný známý enzym, který by mohl katalyzovat takovou biokonverzi. Dále farmakokinetika a studium metabolismu CBD v humánních klinických studiích vyvracejí přítomnost takové reakce. V dvojité zaslepené placebem kontrolované studii hodnotící vliv CBD na pacienty s Huntingtonovou choreou byly 14 pacientům perorálně podány dávky CBD 10 mg/kg/den (přibližně 700 mg) po dobu 6 týdnů [61], průměrné plazmatické hladiny CBD byly 5,9–11,2 ng/ml, ale žádné THC nebylo detegováno. V další recentní randomizované klinické studii byly 16 zdravým mužům podány dávky 600 mg CBD anebo 10 mg THC [62]. Zatímco THC s vysokou mírou signifikace vykazovalo přítomnost negativních vedlejších účinků jako úzkost, dysforii, a psychotropní účinky, CBD bylo pacienty dobře tolerováno bez známek psychotropních účinků vyskytujících se po podání THC. Ani THC, ani jeho primární jaterní metabolit, 11-OH-THC, nebyl zaznamenán po užití CBD [62].

## **1.6. Endokanabinoidní systém (EKS)**

EKS je primárně odpovědný za buněčnou homeostázu. V mozkové tkáni má přímý vliv na fyziologické procesy regulující vnímání bolesti, hormonální, smyslové a mentální funkce. Je tvořen kooperujícími receptory, jejich ligandy, enzymy aktivními v syntéze a/nebo degradaci vazebných molekul, a některými dalšími signálními molekulami [63].

Objev CB1 receptoru v mozkové tkáni potkana [64] vedl k hledání přirozených endogenních ligandů, které se na tento receptor váží. Po dvou letech výzkumu vědci z mozku izolovali endogenní sloučeninu, která se váže na kanabinoidní receptor s přibližně stejnou účinností jako  $\Delta^9$ -THC. Tento endogenní ligand byl pojmenován anandamid [65], jeho název byl odvozen ze Sanskrtského slova pro blaženost „ananda“. Existence periferního kanabinoidního receptoru (CB2) vedla k pátrání po ligandu tohoto receptoru, tím se stal derivát kyseliny arachidonové 2-arachidonoylglycerol (2-AG) [66].

Receptory CB1 se vyskytují primárně v buňkách mozkové tkáně a regulují neuronální aktivity. CB2 receptory jsou lokalizovány v buňkách vrozeného imunitního systému a periferní nervové tkáni a jsou spojovány s regulací protizánětlivé a imunomodulační aktivity. Oba receptory jsou lokalizovány jak na povrchu buněčných membrán, tak intracelulárních strukturách buněk všech tkáních savců [67]. Interakce exo-/endogenních ligandů, tj. fyto- a syntetických kanabinoidů a endokanabinoidů (amidy a estery kyseliny arachidonové) s CB1 a CB2 receptory aktivuje endokanabinoidní systém (EKS) [68, 69]. CBD a psychotropní  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol (THC) jsou kvantitativně nejvíce zastoupené sekundární metabolity ze skupiny fyto-kanabinoidů rodu *Cannabis* [70]. V savčím organismu je biologická aktivita fyto-kanabinoidů vázána na jejich interakci s dvěma subtypy kanabinoidních receptorů CB1 a CB2, patřících mezi receptory spřažené s G-proteiny [71]. CBD je částečný agonista vázající se do ortosterického místa CB2 receptoru a přímý antagonist vázající se do vazebného místa CB1 receptoru. CBD je negativním alosterickým modulátorem vazebných míst obou receptorů [72].

## **1.7. Účinky fyto-kanabinoidů**

### **1.7.1. Vliv fyto-kanabinoidů na tkáň parodontu**

Konermann *et al.* prokázali *in vitro* i *in vivo* expresi CB1 a CB2 receptorů v tkáních parodontu. *In vivo* byla exprese kanabinoidních receptorů zkoumána na biopticky získaných lidských tkáních parodontu s bakteriálním zánětem nebo bez něj, a na maxilách potkana se sterilním zánětem nebo bez něj. *In vitro* analýzy byly prováděny na fibroblastech humánních periodontálních ligament (FHPL) v klidu nebo při mechanickém namáhání (ortodontický tah

zubů) [73]. U FHPL i tkáně parodontu vyvolal zvýšení počtu obou receptorů také mechanický stres, sterilní nebo bakteriální zánět tkáně. V návaznosti na výše uvedenou studii mechanicky stresované FHPL byly inkubovány s endokanabinoidy, anandamidem (AEA) a palmitoyletanolamidem (PEA) po dobu 6 a 10 hod. AEA významně snížil u stresovaných FHPL tvorbu prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  a počet CB1 a CB2 receptorů. Inkubace PEA neměla vliv na exacerbaci imunitní odpovědi [74]. Abidi *et al.* demonstrovali na IL-1 $\beta$  stimulovaných lidských gingiválních fibroblastech (HGFs) inhibici produkce prostaglandinu E2 (PGE2) a některých cytokinů po aplikaci fytokanabinoidů. Produkce PGE2 byla významně potlačena po aplikaci CBG a CBNV. Aplikace CBD vedla k významnému snížení hladiny interferonu-gamma (INF- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , IL-2 a IL-4. Všechny tři testované fytokanabinoidy nicméně významně zvýšily hladiny IL-6, IL-10 a IL-12. Tato zjištění naznačují, že cílení léčby na endokanabinoidní systém může vést k vývoji nových terapeutických postupů u onemocnění parodontu. Je však třeba brát ohled na jedinečné protizánětlivé účinky každého individuálního fytokanabinoidu [75].

CBD je agonistou PPAR- $\alpha,\beta,\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors) [76]. Zánětlivé procesy v tkáních parodontu zvyšují hladinu isoformy PPAR- $\gamma$  [77]. CBD interakcí s PPAR- $\gamma$  aktivuje jeho tvorbu [76]. PPAR- $\gamma$  moduluje průběh zánětu indukci degradace proteinu p65, na kterou navazuje inhibice transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B a důsledkem je snížení produkce COX-2 a prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  [78]. CBD aktivovaný PPAR- $\gamma$  také kooperuje s transkripčním faktorem Nrf2, regulátorem exprese endogenních antioxidantů [79], který má vliv na oxidačně-redukční homeostázu v tkáních parodontu [80, 81].

### **1.7.2. Antioxidační účinky**

Antioxidační kapacita buněk je klíčová v ochraně tkáně před destrukcí kyslíkovými radikály a reaktivními formami kyslíku a dusíku obecně. Antioxidanty jsou látky, které interagují s volnými radikály a neutralizují je. Volné radikály se tvoří v těle přirozeně a jsou důležité pro mnoho fyziologických buněčných procesů. Ve vysokých koncentracích mohou však volné radikály poškozovat součásti buněk, včetně jejich membrán, DNA a proteinů. Poškození způsobené volnými radikály, zejména DNA, může hrát roli v rozvoji rakoviny a dalších nemocí [82]. V rámci výzkumu se zjistilo, že jak CBD, tak i THC jsou vysoce účinné antioxidanty s neuroprotektivním účinkem [83, 84]. Studie naznačují, že tyto antioxidační a protizánětlivé vlastnosti CBD by mohly být využity v rámci terapie orální mukozitidy (OM) [85]. OM je často pozorována u pacientů podstupujících antineoplastickou léčbu, a to asi u 30–70 % pacientů léčených radioterapií oblasti hlavy a krku a u 40–80 % pacientů podstupujících

chemoterapii. Když se tyto dvě modalitty zkombinují, výskyt těchto lézí má tendenci se zvyšovat v rozmezí 50–100 % [85].

### 1.7.3. Vliv CBD na ekologii orální mikroflóry

Pro symbiózu komenzálních bakterií, homeostázu mikrobiálního ekosystému v dutině ústní, je důležitá fyziologická funkce sliny a složení bakteriálního biofilmu na povrchu měkkých a tvrdých tkání [86, 87]. Bakteriostatická aktivita CBD vůči methicillin-rezistentnímu kmenu *Staphylococcus aureus* byla publikována v roce 2008 [88]. Výsledky studie Martinenghiho *et al.* potvrdily výrazný antibakteriální účinek CBD na G-pozitivní, antibiotikům rezistentní, kmeny *S. aureus* a *S. epidermidis* (MIC od 1 do 2 µg/ml) [89]. Nebyl prokázán antimikrobiální účinek na G-negativní *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, což autoři zdůvodnili rozdílnou strukturou vnější membrány G-negativních bakterií. Ta obsahuje vysokou koncentraci LPS a je pro CBD neprostupná.

Blaskovich *et al.* hodnotili minimální inhibiční koncentrace (MIC) CBD ve srovnání s MIC 10 kontrolních antibiotik na vybraných kmenech G-pozitivních/G-negativních bakterií [90]. Bakteriostatický účinek CBD byl srovnatelný s kontrolními antibiotiky používanými v terapii infekčních onemocnění způsobených rezistentními kmeny G-pozitivních bakterií. Z testovaných druhů G-negativních bakterií byl CBD aktivní pouze proti kmenům rodu *Neisseria*. Důležitým zjištěním bylo také to, že opakovaná aplikace CBD nevede ke vzniku bakteriální rezistence.

Abichabki *et al.* hodnotili antibakteriální účinek CBD s polymyxinem B (PB) na PB-rezistentní G-negativní bakterie. Výsledky ukázaly, že přidání PB v nízké koncentraci ( $\leq 2$  µg/ml) umožňuje CBD ( $\leq 4$  µg/ml) působit antibakteriálně pro většinu zkoumaných G-negativních bakterií (např. *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*), a to i těch, které jsou vůči PB rezistentní. CBD + PB také vykazovali aditivní a/nebo synergický účinek proti G-negativním bakteriím [91].

CBD inhibuje uvolňování membránových váčků (MV) z cytoplazmy G-pozitivních/G-negativních bakterií. Funkcí membránových váčků na povrchu bakteriální membrány je ochrana bakterie před adsorpcí antibiotik. CBD regulací uvolňování MV zvyšuje účinek některých antibiotik [92]. Aplikací CBD se mění proteinový profil MV. Taktéž byl pozorován efekt CBD na potlačení růstu u *P. gingivalis* a *F. alocis*, ne však u *T. denticola* [93].

## **2. Onemocnění parodontu**

### **2.1. Ekonomické aspekty onemocnění dutiny ústní**

Ekonomické náklady na péči o orální zdraví jsou značné. Přímé a nepřímé náklady na onemocnění zubů v celosvětovém měřítku (s výjimkou rakoviny dutiny ústní a hrtanu) činily v roce 2015 přibližně 545 miliard amerických dolarů (USD) [94]. V roce 2019 dosáhly výdaje na stomatologii v USA 143,2 miliardy USD [1], což představuje 4 % celkových výdajů na zdravotní péči v zemi [95]. Rozsáhlá ztráta zubů (pacienti s méně než devíti zbývajících přirozenými zuby) představovala 67 % celosvětových ztrát produktivity v důsledku onemocnění zubů a jejich závěsného aparátu, po ní následovala s 21% pokročilá parodontitida (hodnota Community Periodontal Index 4, klinická ztráta attachmentu větší než 6 mm, nebo hloubka parodontálního chobotu větší než 5 mm) a neléčený kaz s 12% podílem [96]. Změny vzhledu obličeje a halitóza, které tyto stavy často doprovází, mohou vést k narušení sociálních interakcí jedince a tím sníženému sociálnímu uplatnění.

### **2.2. Parodontitis chronica**

#### **2.2.1. Epidemiologie**

Parodontitis je definována jako zánětlivé onemocnění závěsného aparátu zubu, které může způsobit ireverzibilní ztrátu periodontálních vazů a alveolární kosti a vést až ke ztrátě zubu [97]. Parodontitis postihuje 20–50% světové populace [98] a je považována za šestou nejrozšířenější nemoc na celém světě, která postihuje odhadem 740 milionů lidí [99]. Výskyt parodontitis je rozšířenější u starších jedinců (Tab. 2). Vzhledem ke stárnutí populace (zejména v západních zemích) se v blízké budoucnosti očekává nárůst prevalence tohoto onemocnění [99, 100].

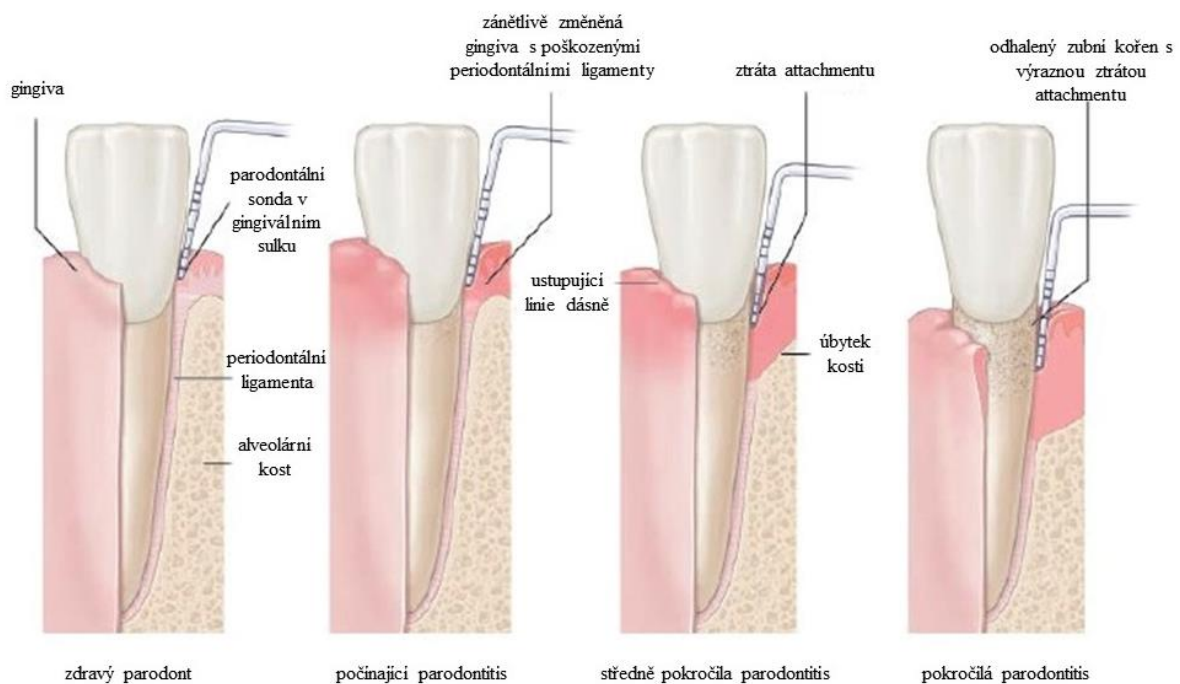
		parodontitis % (směrodatná odchylka)		
		pokročilá	středně pokročilá	celkem
<b>celkem</b>		7,8 (0,5)	34,4 (1,2)	42,2 (1,4)
<b>věk (roky)</b>	<b>30-44</b>	4,1 (0,3)	25,3 (1,4)	29,5 (1,5)
	<b>45-64</b>	10,4 (0,8)	35,6 (1,4)	46,0 (1,6)
	<b>≥65</b>	9,0 (1,0)	50,7 (1,9)	59,8 (2,1)
<b>pohlaví</b>	<b>muži</b>	11,5 (0,8)	38,8 (1,2)	50,2 (1,4)
	<b>ženy</b>	4,3 (0,4)	30,2 (1,4)	34,6 (1,5)

**Tab. 2: Prevalence parodontitis v USA u pacientů starších 30 let (2009-2014).** Převzato z Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA, Genco RJ. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. J Am Dent Assoc. [101]

### 2.2.2. Etiologie

Zachování orálního zdraví nebo progresse onemocnění je úzce spjata s orálním mikrobiomem [102]. Mikrobiom dutiny ústní je tvořen více než 700 druhy bakterií [103], které jsou přítomny ve formě biofilmu. Hraje zásadní roli v udržování orální homeostázy, chrání dutinu ústní a zabraňuje rozvoji onemocnění [104]. Narušení orálního mikrobiomu (disbióza) společně s dalšími rizikovými faktory, kterými mohou být například kouření, nedokonalá ústní hygiena, diabetes mellitus, hormonální změny u žen, medikace některých léčiv (fenytoin, cyklosporin, nifedipin) a stres může vést k rozvoji chronické gingivitis a následně parodontitis [105]. Mezi nejvýznamnější patogeny podílející se na rozvoji parodontitis u dospělých jedinců se řadí bakterie červeného komplexu – *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* a *Tannerella forsythia* (dříve označována jako *Bacteroides forsythus*). Dalšími periopatogeny jsou například *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* [106].

Přítomnost periopatogenů a jejich virulentních komponent způsobuje aktivaci buněk vrozeného imunitního systému (makrofágy, antigen prezentující dendritické buňky, natural killer (NK) buňky a neutrofilů) a buněk adaptivní imunity (T a B lymfocyty), což vede k uvolňování prozánětlivých cytokinů (IFN- $\gamma$ , IL-1 a IL-6, interleukinu-17 (IL-17), TNF- $\alpha$ , prostaglandinu E2 (PGE2) a enzymů, především kolagenas (matrixová metaloproteinasa) [107]. Pokud není regulace zánětlivého procesu tělem hostitele dostatečná, může vyústit v závažné změny v tkáních periodontia začínající u ztráty attachmentu, vzniku parodontálních chobotů, gingiválních recesů, vedoucí viklavosti zubů, jejich mobilitě a končící ztrátou zubu [108] (Obr. 4).



**Obr. 4: Stádia parodontálního onemocnění.** Upraveno dle: Jonathan Dimes, převzato z National Institutes of Health. Oral health in America: advances and challenges. US Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research: Bethesda, MD, USA. 2021. [1]



### 2.2.3. *Klasifikace*

#### **Parodontitis se u pacienta diagnostikuje pokud:**

- 1) je přítomna klinická ztráta attachmentu v mezizubním prostoru u dvou a více nesousedících zubů, nebo
- 2) je přítomna klinická ztráta attachmentu vestibulárně nebo orálně  $\geq 3$  mm současně s parodontálním chobotem  $>3$  mm u dvou a více zubů.

Podmínkou je, že klinická ztráta attachmentu není způsobena jinými faktory, jako je např. gingivální recessus traumatického původu, rozsáhlé cervikální kariézní léze, přítomnost vertikální fraktury kořene, změny objemu tkání po extrakci sousedních zubů [109].

Pro přesnější popis progresu onemocnění v roce 2018 navržena klasifikace parodontitis, která využívá stagingu (Obr. 5) a gradingu (Obr. 10) stejně jako je tomu v jiných medicínských oborech [110].

**Staging** je založený na závažnosti postižení, které je dáno destrukcí parodontu vzhledem k délce kořene a také ztrátou zubů v důsledku parodontitis. Dalším faktorem je komplexnost onemocnění, která je ovlivněna hloubkou parodontálních chobotů, přítomností nitrokostních defektů, postižením furkací, mírou pohyblivosti zubu a také změnami artikulace. Dle toho zahrnuje čtyři stadia (I až IV), viz. níže uvedené ortopantomogramy (Obr. 6-9). Po léčbě stále zůstává staging stejný, i když došlo k eliminaci faktorů [109].

Staging parodontitis		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
závažnost postižení	klinická ztráta attachementu interdentálně	1 – 2 mm	3 – 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	ztráta kosti na RTG	koronální třetina (<15 %)	koronální třetina (15 – 33 %)	střední až apikální třetina kořene	střední až apikální třetina kořene
	ztráta zubů	žádná		≤ 4	≥ 5
komplexnost onemocnění		max. hloubka chobotů ≤ 4 mm zejména horizontální úbytek kosti	max. hloubka chobotů ≤ 5 mm zejména horizontální úbytek kosti	oproti stage II: hloubka chobotů ≥ 6 mm vertikální úbytek kosti furkační def. II a III. třídy střední defekt alveolu	oproti stage III: potřeba komplexní rehabilitace kvůli: dysfunkce mastikace sekundární traumatická artikulace (stupeň viklavosti ≥2) rozsáhlý defekt alveolu rozestup a putování zubů méně než 20 zbylých zubů (10 antagonistních párů)
	rozsah a lokalizace	lokalizovaná (<30 % zubů postiženo) / generalizovaná (nad 30 % zubů postiženo) / molárovo-řezáková oblast			

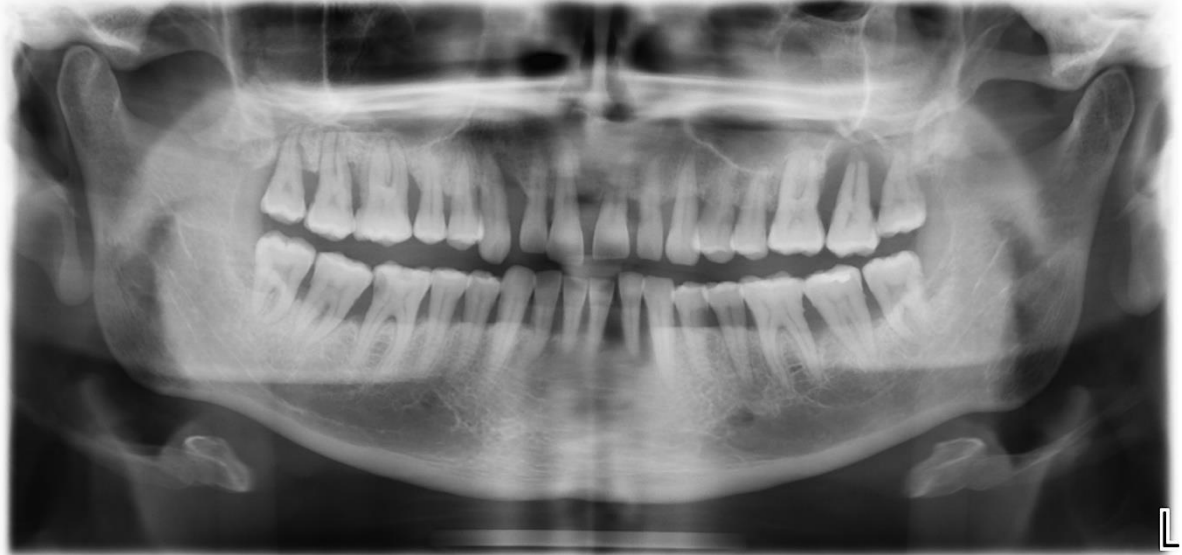
**Obr. 5: Staging parodontitis.** Převzato z Belák Š, Starosta M, Žižka R, Šedý J. Nová klasifikace parodontálních a periimplantátových onemocnění. LKS: časopis České stomatologické komory. 2019;29(1):10-7. [109]



**Obr. 6: Ortopantomogram, Stage I parodontitis. Autor: MDDr. Petr Jirásek.**



**Obr. 7: Ortopantomogram, Stage II parodontitis. Autor: MDDr. Petr Jirásek.**



**Obr. 8: Ortopantomogram, Stage III parodontitis. Autor: MDDr. Petr Jirásek.**



**Obr. 9: Ortopantomogram, Stage IV parodontitis. Autor: MDDr. Petr Jirásek.**

**Grading** představuje informaci o rychlosti progresu parodontitidy. Zohledňuje rizikové faktory, které mohou ovlivnit průběh onemocnění nebo odezvu na léčbu, a jejich negativní efekt na celkové zdraví pacienta. Dle toho se dělí do tří skupin: pomalá, středně rychlá a rychlá [109].

Grading parodontitidy			Grade A pomalá progresse	Grade B středně rychlá progrese	Grade C rychlá progresse
primární kritéria	přímý důkaz progresse	dlouhodobá data (RTG úbytek kosti nebo ztráta attachmentu)	žádný úbytek za 5 let	<2 mm za 5 let	≥2 mm za 5 let
	nepřímý důkaz progresse	% úbytek kosti/věk	<0,25	0,25–1,0	>1,0
		typ případu	nánosy plaku s malou destrukcí	destrukce úměrná množství plaku	poškození tkáně převyšuje očekávání pro dané množství plaku období rychlé progresse postižení oblasti molárů a řezáků slabá reakce na běžnou terapii
faktory ovlivňující grade	rizikové faktory	kouření	nekuřák	<10 cigaret denně	10 a více denně
		diabetes	normoglykemie	HbA1c <7 % u pacientů s diabetem	HbA1c ≥7 % u pacientů s diabetem
ovlivnění celkového zdraví biomarkery	zánět	vysoce senzitivní C- reaktivní protein	<1 mg/l	1–3 mg/l	>3 mg/l
	indikátory ztráty attachmentu nebo kosti	slina, sulkulární tekutina, sérum	?	?	?

**Obr. 10: Grading parodontitidy.** Převzato z Belák Š, Starosta M, Žižka R, Šedý J. Nová klasifikace parodontálních a periimplantátových onemocnění. LKS: časopis České stomatologické komory. 2019;29(1):10-7. [109]

#### **2.2.4. Kouření jako rizikový faktor vzniku parodontitis**

Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů vzniku parodontitis je kouření [111]. U kuřáků je třikrát větší pravděpodobnost závažné formy parodontitis než u nekuřáků [112]. Cesty, kterými kouření tabáku ovlivňuje výskyt a progresi parodontitidy, zůstávají nejasné; existují však hypotézy o některých potenciálních mechanismech. Zahrnují vliv kouření na složení orálního mikrobiomu, na imunitní odpověď a na regenerační schopnost parodontu. Zastává se názor, že kouření může vést ke změnám ve složení subgingiválního biofilmu vedoucím ke zvýšením prevalence periodontálních patogenů [113]. Kouření se navíc podílí na zpoždění nábory a migrace neutrofilů do tkání parodontu, což ohrožuje akutní imunitní odpověď [114]. Kromě toho existuje hypotéza, že ve vodě rozpustné složky cigaretového kouře přímo indukují neutrofilní produkci superoxidů, a zároveň snižují reakce superoxidů na patologicky relevantní podněty. Tato data naznačují, že kouření může iniciovat a udržovat oxidační stres ve zdravém parodontu a podílet se na progresi onemocnění, a to neutrofilny zprostředkovanými mechanismy, které vedou ke snížení vrozených imunitních reakcí [115].

Dalším rizikovým faktorem pro vznik onemocnění parodontu je kouření marihuany, a to i nezávisle na tabáku, i když lze pozorovat synergický účinek vedoucí k vyšší prevalenci parodontitidy u jedinců, kteří užívají obě formy [116, 117]. U pravidelných uživatelů marihuany se v rámci vyšetření parodontu vyskytují hlubší parodontální choboty, vyšší ztráta attachmentu a zvýšená pravděpodobnost závažného průběhu parodontitis než u lidí, kteří marihuanu rekreačně nekonzumují. Vzhledem k celosvětové tendenci k legalizaci marihuany by měli být stomatologové na pozoru a přikládat roli užívání konopí na rozvoj parodontitis patřičný význam [117]. Užívání marihuany se často vyskytuje v kombinaci s užíváním alkoholu, elektronických cigaret a jiného tabáku, takže je obtížné určit, zda etiologie zhoršeného zdraví ústní dutiny (např. vyšší výskyt parodontitidy a zubního kazu) souvisí pouze s užíváním marihuany [118, 119]. Projevy kouření marihuany v dutině ústní jsou shrnuty v (Tab. 3).

<b>Kouření/vaporizace marihuany a jejich projevy v dutině ústní</b>	<b>Související důsledky</b>
<b>Parodontóza</b> [117] [120] [121] (důkazy s největší vahou)	Přispívá k rozvoji, nicméně nevyvolává parodontitis; zvyšuje ztrátu attachmentu; hlubší parodontální choboty; závažnější parodontóza
<b>Xerostomie</b> [122, 123]	Zvýšení rizika vzniku zubního kazu v důsledku absence sliny a jejich ochranných funkcí
<b>Leukoedém</b> [122, 123]	Multifaktoriální: společné užívání alkoholu, tabáku + genetická predispozice
<b>Zvýšená prevalence <i>Candida</i> sp.</b> [123]	Zvýšené riziko kandidózy
<b>Vznik kazu na hladkých ploškách</b> [124]	Multifaktoriální: snížená motivace v péči o orální zdraví
<b>Snížené úsilí v udržování orální hygieny a vyhledávání zubní péče</b> [124]	Zvýšené riziko vzniku zubního kazu, gingivitidy a parodontitidy

**Tab. 3: Projevy a důsledky kouření marihuany na dutinu ústní.** Převzato z National Institutes of Health. Oral health in America: advances and challenges. US Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research: Bethesda, MD, USA. 2021. [1]

### 2.2.5. Vztah orálního mikrobiomu k celkovým onemocněním

Orální mikroorganismy mohou ovlivnit vznik systémových onemocnění. Studie naznačují, že mikrobiom v dutině ústní může kolonizovat různé části organismu a podílet se na chorobných procesech v jiných částech těla [125]. *P. gingivalis*, bakterie silně spojená s parodontitis, byla detekována v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou. Pravděpodobný podíl *P. gingivalis* jako přispěvatele rozvoje tohoto onemocnění byl prokázán na zvířecím modelu [126].

Kromě toho bylo také prokázáno úzké spojení mezi chronickou parodontitidou a revmatoidní artritidou (RA), parodontitis často předchází rozvoji RA. V revmatoidní synovii se nalézají citrulinové proteiny, které jsou pro RA vysoce specifické (specifita 98,5 %) a jsou využívány při diagnostice RA [127]. Parodontitida u zdravých jedinců koreluje s hladinami protilátek proti citrulinovým proteinům, což naznačuje, že parodontitida by mohla spustit autoimunitní odpověď, která vede k RA [128].

Parodontální onemocnění je také považováno za nezávislý rizikový faktor mozkové ischemie u mužů a mladších jedinců [129]. Elevace hladiny cytokinů (IL-6 a IL-8) a PGE2 produkovaných při parodontitis může vést u těhotných žen k vyššímu riziku ruptury plodového obalu zárodku (chorioamnion), a tím k předčasnému porodu [130, 131].

Zvýšená hladina cytokinů, která se vyskytuje u pacientů s parodontózou může negativně ovlivnit průběh onemocnění COVID-19. Parodontitida byla spojena s vyšším rizikem přijetí na jednotku intenzivní péče, potřebou umělé plicní ventilace a úmrtím pacientů s COVID-19 [132]. Studie naznačují, že prediktorem plicních komplikací COVID-19 je zvýšení hladiny IL-6. Parodontitida zvyšuje hladiny IL-6 jak lokálně, tak systémově. Terapie parodontitis může vést ke snížení hladiny IL-6, a tím redukovat riziko závažných plicních komplikací spojených s onemocněním COVID-19 [133].



## **2.2.6. Chemoprophylaxe gingivy**

### **2.2.6.1. Tvorba biofilmu**

K udržení parodontálního zdraví je nezbytné eliminovat přítomnost biofilmu na zubech a měkkých tkáních. Biofilm je společenstvo mikroorganismů vázané k určitému povrchu a obklopené polysacharidy, které buňky biofilmu vylučují [134]. Zrání biofilmu je vícefázový proces, který začíná krátce po vyčištění zubů tvorbou pelikuly adsorpcí komponent sliny (proteiny, sacharidy, lipidy) k povrchu zubů a materiálům používaných ke zhotovování výplní a protetických náhrad. Vzniká slabá reverzibilní vazba mikroorganismů k pelikule. Následně je na povrchu časných kolonizátorů (*Actinomyces* sp., *Streptococcus* sp.) [135] secernována extracelulární polysacharidová hmota (EPS), kterou tvoří polysacharidy, proteiny a další makromolekuly. EPS poskytuje vazebná místa pro další mikroorganismy. 3–5 den dochází během sekundární kolonizace ke koagregaci mezi spřátelenými druhy bakterií a k přechodu na ireverzibilní adhezivní vazbu. Adherující buňky proliferují do mikrokolonií, a za 2–3 týdny vytvoří zralý biofilm (v závislosti na přítomnosti O<sup>2</sup>, pH a živin). Po maturaci může dojít k disperzi bakterií pomocí organizovaného uvolnění buněk z kolonií, čímž dochází ke kolonizaci nových míst [136-138].

### **2.2.6.2. Prostředky ústní hygieny**

Kromě mechanického odstraňování zubního plaku z povrchu zubů používáme v dnešní době i široké spektrum podpůrných léčebných a kosmetických přípravků. Mezi účinné látky těchto přípravků řadíme fluorid sodný a cínatý, chlorid a síran zinečnatý, laktát hlinitý a další (Tab. 4). V rámci syntetických organických sloučenin se nejčastěji využívají aminfluorid, chlorhexidin, hexetidin, cetylpyridinium chlorid. Další možností jsou komplexní extrakty/směsi sekundárních metabolitů léčivých rostlin – fytoceutika [139]. Bioaktivní molekuly získávané z léčivých rostlin jsou po tisíce let využívány k potlačení zánětu a bolesti. Zároveň se jedná o potenciální zdroj látek využitelných při léčbě gingivitis a parodontitis [140]. Fytoceutikem, pro jehož vliv na zanícené tkáně parodontu není dostatek farmakologických údajů je kanabidiol. Fytokanabinoidy je třeba rozlišit od chemicky rozdílných, avšak po farmakologické stránce podobných endokanabinoidů a syntetických kanabinoidů [141].

Sloučeniny	Zástupci
<b>Enzymy</b>	proteasy, lipasy, nukleasy, dextranasa, glukózooxidasa, amyloglukosidasa
<b>Bisbiguanidy</b>	chlorhexidin, octenidine
<b>Kvartérní amoniové sloučeniny</b>	cetylpyridinium chlorid, benzalonium chlorid
<b>Fenoly</b>	thymol, 4-hexylresorcinol, 2-fenylfenol, eukalyptol, listerine
<b>Fluoridy</b>	fluorid sodný, monofluorofosforečnan sodný, fluorid cínatý, aminfluorid
<b>Ionty kovů</b>	měď, zinek, cín
<b>Oxidační činidla</b>	peroxydy
<b>Další antiseptika</b>	jód, povidone iodine, chloramin-T, chlornan sodný, hexetidín, triklosan, salifluor, delmopinol

**Tab. 4: Účinné látky prostředků ústní hygieny.** Převzato z Balagopal S, Arjunkumar R. Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2013;5:270-4. [142]

**Chlorhexidin diglukonát (CHX)** patří, pro své baktericidní účinky proti G-pozitivním, G-negativním bakteriím a kvasinkám, mezi široce užívané chemoprofylaktikum, a je „zlatým standardem“ při léčbě onemocnění parodontu [142]. Výplach úst 10 ml 0,2 % roztokem CHX vedl k potlačení tvorby nových deposit plaku, zároveň došlo k poklesu ve slině obsažených bakterií o 80–90 %, po ukončení terapie došlo k obnově plaku a objemu bakterií ve slině na původní hodnoty během 48 hod. [143]. Adsorpční schopnost CHX k aniontovým substrátům (hydroxyapatit, pelikula, glykoproteiny obsažené ve slině a sliznice) zajišťuje postupné uvolňování účinné látky až po dobu 24 hod. [143]. Ve srovnání s placebem má použití CHX u mechanického odstranění biofilmu v rámci terapie parodontitis jako je scaling a root planing spíše doplňkový charakter [144]. Jako výhodné se jeví doplňkové použití ústní vody s CHX u pacientů s fixním ortodontickým aparátem, kde bylo dosaženo zlepšení gingivitidy, kontroly plaku a zmenšení sondáže [145]. Nevýhodou dlouhodobého užívání CHX je žlutohnědé zbarvení zubů (lze odstranit profesionálním čištěním), přechodné ovlivnění vnímání chuti a hořká příchuť [143].

### 2.2.7. *Terapie parodontitis*

Hlavní cíl parodontologické léčby spočívá v mechanickém odstranění biofilmu a zubního kamene ze subgingiválního prostředí buď ručními nástroji, nebo ultrazvukovými přístroji, prováděným chirurgicky nebo nechirurgicky, spolu s přísným režimem kontroly plaku jak během samotné léčby, tak i v navazujících kontrolních návštěvách. I když je známo, že úplné odstranění subgingiválního plaku a zubního kamene je nereálné, zvláště když se zvětšuje hloubka parodontálních chobotů, přesto lze očekávat, že většina pacientů s chronickou parodontitidou bude úspěšně po chirurgické i nechirurgické parodontální terapii udržována ve stabilizovaném stavu [146].

Četné studie prokázaly srovnatelnou účinnost použití ručních nástrojů a ultrazvukových přístrojů při scalingu a root planingu. Použití ultrazvuku je ve srovnání s manuálním odstraňováním zubního kamene o 20–50 % rychlejší [147, 148]. V závislosti na anatomii ošetřované oblasti a odolnosti zubního kamene je někdy potřeba využít oba přístupy.

20–30 % pacientů dostatečně nereaguje kvůli různým rizikovým faktorům [105] na konvenční léčbu [149]. U těchto pacientů je možné s výhodou využít podpurné antibiotické léčby. Díky rozvoji nových vyšetřovacích metod jako je například sekvenování genu 16S rDNA, je v dnešní době možné určit složení orálního mikrobiomu a zacílit na známé periopaty. Nevýhodou antibiotické léčby je fakt, že bakterie jsou v dutině ústní přítomny ve formě biofilmu, který až 500× zhoršuje penetrační schopnost antibiotik [150]. Testování citlivosti periopaty vůči antibiotikům může být přínosné a poskytnout lékaři určité vodítko [151]. Tuto službu však nabízí jen velmi málo laboratoří. Přesnost testování citlivosti je dále přímo závislá na odběru reprezentativního vzorku a ochraně tohoto vzorku před oxidací, a to jak při odběru, tak při přepravě do laboratoře, vzhledem k tomu, že většina parodontálních patogenů je striktně anaerobních, což znesnadňuje jejich kultivaci. V současné době je lékem volby na základě empirického použití i klinického testování menšího rozsahu kombinace amoxicilinu (250–500 mg) a metronidazolu (250–500 mg) podávaná třikrát denně po dobu 7 až 10 dnů [152, 153].

Adekvátní kontrola plaku, stejně jako odstranění bakterií, zubního kamene a granulační tkáň mechanickými nástroji představuje účinný přístup ke snížení známek zánětu ve většině případů chronické parodontitidy. Vzhledem k multifaktoriální povaze parodontitis, si však zubní lékaři musí být vědomi lokálních i systémových rizik, které mohou negativně přispívat k průběhu onemocnění a k hojení parodontu. Proto je diagnostika chronické parodontitidy v raném stadiu

a vyhodnocení každého možného rizikového faktoru zásadní pro dlouhodobě udržení parodontálního zdraví.

### **2.2.7.1. Vliv CBD na tvorbu prozánětlivých cytokinů buňkami imunitního systému**

Orální mikrobiom je personalizovaný a spektrum virulentních komponent jednotlivých kmenů bakterií není identické. V mechanistických studiích je nejčastěji používanou virulentní komponentou lipopolysacharid z *P. gingivalis*, lipidická složka vnější bakteriální membrány. LPS je virulentní komponentou všech orálních anaerobních patogenů. Studie účinků CBD na tkáň parodontu byly převážně prováděny na buněčných kulturách lidských gingiválních fibroblastů, keratinocytů, fibroblastů periodontálních ligament, mesenchymálních kmenových buněk a monocytů intoxikovaných LPS. Byly sledovány účinky koncentrace a doby inkubace CBD na životnost testovaných buněk a potlačení produkce prozánětlivých faktorů po LPS stimulaci. Výsledky několika recentních studií jsou uvedeny v Tab. 5. Po 1–6 dnech inkubace samotným CBD s gingiválními fibroblasty došlo ke zvýšení produkce fibronektinu a exprese TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) s poklesem aktivity matrixových metaloproteinů [154]. Výsledky studie ukázaly, že aplikace CBD by mohla pozitivně ovlivnit regeneraci pojivové tkáň parodontu. Na druhé straně, kombinace CBD s LPS má imunopresivní vliv [93, 155-160].

K vyvolání parodontitidy u laboratorních zvířat je používána řada metod a přístupů [161]. Napimoga *et al.* testovali markery parodontitidy vyvolané tenzidem Tween 80 (polysorbát 80) na modelu ligatury moláru [162]. Po dobu 30 dnů bylo laboratorním potkanům *i.p.* aplikováno 5 mg/kg CBD rozpuštěného ve vehikulu (2% Tween 80 ve fyziologickém roztoku) nebo čisté vehikulum jako placebo. Oproti placebo, CBD zpomalil úbytek alveolární kosti redukcí produkce ligandy RANKL/RANK receptoru-aktivátoru NF- $\kappa$ B. Dále došlo ke zpomalení migrace neutrofilů a tvorby prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ .

Typ buňky (kultivace)	Koncentrace a doba inkubace s CBD a LPS	Sledované markery	Výchozí forma CBD	Lit.
GF* (PBK)	0,01-30 $\mu$ M CBD; 24-144 hod.	$\uparrow$ TGF- $\beta$ , $\uparrow$ fibronektin, $\downarrow$ MMP-1, $\downarrow$ MMP-2	1 mg/ml, metanol	[154]
GMSC* (PBK)	5 $\mu$ M CBD; 24 hod.	$\downarrow$ exprese prozánětlivých genů	0,1 % v DMSO	[163]
TIGK* (BL)	1,0 $\mu$ g/ml CBD + 0,1 $\mu$ g/ml LPS; 20 hod.	$\downarrow$ IL-6, $\downarrow$ IL-8, $\downarrow$ IL-12, $\downarrow$ TNF- $\alpha$	1,0 mg/ml, metanol	[93]
PBMC* (PBK)	CBD stimulované PBMC + 1,0 $\mu$ g/ml LPS; 48 hod.	$\downarrow$ TNF- $\alpha$	<i>per os</i> dávka 30 mg rozpustného CBD. Po 90 min. izolace PBMC	[155]
MMF (BL RAW 264.7)	preinkubace 10, 30, 100 a 300 $\mu$ M CBD; 0,5 hod., + 1,0 $\mu$ g/ml LPS; 4 hod.	$\downarrow$ TNF- $\alpha$	Cremophor/etanol/kultivační médium (1:1:18)	[160]
PBMC (PBK)	0,5, 1, 5 a 10 $\mu$ M CBD + 10 ng/ml LPS; 22 hod.	$\downarrow$ IL-1 $\beta$ , $\downarrow$ IL-6, $\downarrow$ IL-10, $\downarrow$ TGF- $\beta$ 1	neuveďeno	[159]
MSC* (PBK)	3 $\mu$ M CBD + 10 $\mu$ g/ml LPS; 48 hod.	Beze změny IL-2, IL-5, IL-6, IL-18, TNF, VEGF, IGF, TGF- $\beta$	0,01% v etanolu	[158]
MMF (BL RAW 264.7)	preinkubace 2,5 a 5 $\mu$ M CBD; 2 hod. + 10 $\mu$ g/ml LPS; 24 hod.	$\uparrow$ IL-10, $\downarrow$ Nrf2, $\downarrow$ iNOS, $\downarrow$ TLR4, $\downarrow$ NF- $\kappa$ B	0,1% v DMSO	[157]
MONO (BL U937)	10,6 $\mu$ M CBD + 1,0 $\mu$ g/ml LPS; 24 hod.	$\downarrow$ IL-8, $\downarrow$ IL-6, $\downarrow$ TNF- $\alpha$	neuveďeno	[156]

**Tab. 5: Účinek CBD na LPS indukovanou expresi prozánětlivých markerů u některých typů buněk.** Převzato z Jirasek P, Jusku A, Simanek V, Frankova J, Storch J, Vacek J. Cannabidiol and periodontal inflammatory disease: A critical assessment. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2022;166(2):155-60. [48]

\*Buňky byly izolovány z tkání zdravých dobrovolníků; PBK, primární buněčná kultura; BL, buněčná linie; GF\*, humánní gingivální fibroblasty; GMSC\*, humánní mezenchymální kmenové buňky gingivy; TIGK\*, humánní gingivální keratinocyty; PBMC\*, periferní krevní mononukleární buňky; MMF (RAW 264.7), buněčná linie myších makrofágů; HMSC, humánní mesenchymální kmenové buňky; MONO(U937), buněčná linie monocytů.

### 2.2.7.2. Pilotní klinické studie o účinku CBD na chronický zánět a regeneraci parodontu

Vývoj přípravků ústní hygieny (pasty, ústní vody, zubní gely) obsahujících CBD vychází z jeho analgetických, hojivých a protizánětlivých účinků, ale také z popularity rostlin rodu *Cannabis* v tradiční/komplementární medicíně. Účinky CBD na zánětlivá onemocnění gingivy a parodontu byly většinou studovány, s výjimkou několika experimentů na laboratorních zvířatech, na primárních buněčných kulturách nebo buněčných liniích [164]. Jedním z potencionálních mechanismů terapie parodontitis je účinek kanabinoidů na zvýšení endogenních ligandů EKS [165]. Léčba fytoKANABINOIDY proto může upregulovat hladinu anandamidu, k jehož zvýšení dochází v místech poranění. Anandamid dále zvyšuje fibroblastickou proliferaci a podporuje hojení tkání [166]. Na pacientech byly realizovány pouze 2 pilotní studie. Cílem první studie bylo ověřit *in vitro* antimikrobiální účinky kanabinoidů, CBD, CBC, CBN, CBG a kanabigerolové kyseliny (CBGA), ve srovnání se zubními pastami Oral B a Colgate [167]. Pacienti (věk 18–45 roků,  $n=60$ ) byli rozděleni podle DPSI (Dutch periodontal screening index) do 6. skupin ( $n=10$ ). Po 24 h kultivaci bakterií, z plaku odebraného jednotlivým subjektům, na agarových plotnách, potřených 12,5% roztokem kanabinoidu nebo zubní pastou, byl podle počtu kolonií baktericidní účinek kanabinoidů statisticky výrazně lepší než u komerčních past. Stejní autoři publikovali studii, ve které srovnávali baktericidní efekt ústních vod obsahujících 1% CBD nebo CBG (bez fluoridu a etanolu) s 0,2% chlorhexidin diglukonátem nebo ústní vodou obsahující esenciální oleje a etanol [168]. Pacienti ve věku 18–83 roků ( $n=72$ ) byli rozděleni podle DPSI do 3 skupin. Hodnocení ústních vod podle počtu kolonií po 24 hod. kultivaci ukázalo na srovnatelný baktericidní účinek CBD/CBG s chlorhexidin diglukonátem. Nicméně, autoři obou studií nehodnotili, které druhy bakterií v koloniích přežily a zda nedošlo k narušení ekologie ústní mikroflóry ve prospěch patogenních bakterií.

### **2.2.8. CBD a jeho anxiolytické účinky ve vztahu ke strachu ze zubního ošetření**

Kromě výše zmíněných antibakteriálních a protizánětlivých účinků potenciálně využitelných při terapii zubního kazu a chronické parodontitidy se nadějně jeví i anxiolytické účinky CBD při potlačení strachu ze zubního ošetření. Strach ze zubního ošetření je definován jako negativní reakce na skutečnou nebo domnělou hrozbu nebo obava z budoucí hrozby spojená se zubním ošetřením nebo prostředím zubní ordinace. Jedná se o nejčastější psychologický stav pozorovaný ve stomatologii, který postihuje 10–20 % dětské populace a zahrnuje řadu fyziologických, psychologických a behaviorálních reakcí [169]. Postupy, které byly vyvinuty pro zvládnutí strachu ze zubního ošetření, zahrnují nefarmakologické přístupy, jako je 1. navázání dobré komunikace a vztahu mezi zubařem a pacientem, 2. systémová desenzibilizace 3. hypnóza 4. kognitivně behaviorální terapie – typ psychologické terapie zaměřené na odstranění negativních myšlenek spojené s úzkostí a strachu ze zubního ošetření a 5. farmakologické intervence, jako je intravenózní sedace, inhalační sedace, lokální a celková anestezie [49]. Některé důkazy nasvědčují tomu, že CBD může za určitých podmínek při středních dávkách snížit úzkost [170]. Randomizovaná klinická studie se 120 zdravotnickými pracovníky nasazenými v první linii, kteří pečovali o pacienty s COVID-19, prokázala zlepšené skóre úzkosti, deprese a emočního vyčerpání u těch, kteří užívali perorálně CBD (150 mg dvakrát denně po dobu čtyř týdnů) spolu se standardní péčí, ve srovnání s těmi, kterým se dostávalo pouze standardní péče [171]. U pěti pacientů ze skupiny užívající CBD došlo k výskytu vážnějších vedlejších účinků (4 – zvýšení jaterních enzymů, 1 – lékový exantém). Studie byla taktéž limitovaná jejím provedením (nebyla dvojitě zaslepená a chyběla placebem kontrolovaná skupina).

Pacienti a uživatelé CBD považují tuto látku za prostředek ke zvládnutí úzkosti [172]. Nicméně terapeutický přínos CBD pro léčbu úzkosti nebyl dosud dostatečně podpořen výsledky z randomizovaných klinických studií.

### 2.2.9. Kritické posouzení

Pro hodnocení protizánětlivého účinku CBD v dutině ústní sehrává klíčovou úlohu nejenom jeho působení na tkáň parodontu, ale také interakce CBD s orálním mikrobiomem, resp. bakteriálním osídlením subgingiválního prostoru. Zásah CBD do vzájemné komunikace (interplay) mezi G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>-bakteriemi a buňkami parodontu (vč. buněk imunokompetentních) může vést k prokazatelnému protizánětlivému či cytoprotektivnímu účinku. Při interpretaci studií popisujících protizánětlivé působení CBD, je ovšem nutné vzít v úvahu jeho imunosupresivní působení. CBD může oslabit imunitní systém parodontu a zabránit eliminaci periopatogenů. Přechod akutní fáze bakteriální infekce do chronické může nastat především při dlouhodobé aplikaci CBD. Dále, CBD je exogenním ligandem CB receptorů. Aktivace EKS nejenom že iniciuje protizánětlivou reakci prostřednictvím CB2 receptoru, ale také celkově zasahuje do vysoce personalizovaného EKS parodontu či jiných tkání. Konkrétně je známo, že CBD zpomaluje hydrolýzu endogenních kanabinoidů. Pozitiva a/nebo negativa tohoto zásahu do EKS jako celku (holistický pohled) nejsou dostatečně prozkoumány. Taktéž nejsou k dispozici poznatky o interakci CBD s komponentami slin, což by mohl být jeden z dalších výzkumných cílů do budoucna. CBD vykazuje pleiotropní působení a jeho účinek na jednotlivé signální dráhy a procesy parodontu/slin bude silně ovlivněn tím, zda bude podán jako profylaktikum nebo bude aplikován v průběhu již rozvinutého zánětu. Taktéž významnou úlohu bude sehrávat aplikovaná dávka, a to i s ohledem na složení orální mikroflóry a doposud nedostatečně prozkoumané antimikrobiální aktivity fytoKANABINOIDŮ vůči G<sup>-</sup>-baktériím. CBD je látka vykazující bifazický účinek. Aplikované koncentrace CBD ve výše popsáných experimentech nemusí odpovídat koncentracím, které mohou být (nebo běžně jsou) topicky aplikovány v klinické praxi nebo ve formě prostředků ústní hygieny. Jako zásadní krok pro další pochopení úlohy CBD v zánětu parodontu bude design a realizace plnohodnotných klinických studií. Intervenční placebem kontrolovaná randomizovaná klinická pozorování doposud zveřejněna nabyta a představují hlavní výzvu, pokud jde o reálné hodnocení využitelnosti CBD v profylaxi a léčbě zánětu parodontu. Pro provedení klinických studií je důležité, aby byl podáván čistý, synteticky připravený CBD nikoli extrahovaný CBD, kde je vždy riziko kontaminace dalšími látkami, nebo komplexní rostlinné extrakty. Kromě CBD, disponujeme minimálními znalostmi o protizánětlivém působení a interakci dalších nepsychotropních fytoKANABINOIDŮ s parodontem. Taktéž chybí informace o analgetickém účinku CBD na tkáň dutiny ústní.



Tyto poznatky vedly k realizaci hodnocení antimikrobiálních účinků CBD *in vitro* a provedení randomizované dvojitě zaslepené placebem kontrolované klinické studie zaměřené na protizánětlivé působení CBD na tkáň parodontu, jejíž výsledky jsou prezentovány dále.

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3. Preklinická studie

Testování antimikrobiálních účinků nepsychotropních kanabinoidů na vybraných orálních bakteriích *in vitro*

#### 3.1. Metodika

Testované kmeny:

*Streptococcus mutans* CCM 7409

*Porphyromonas gingivalis* CCM 3985

*Lactobacillus acidophilus* CCM 4833

*Lactobacillus casei* CCM 1825

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* CCM 4688

*Eikenalla corrodens* CCM 5985

Kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů, Brno (CCM)

Testované extrakty a substance

**CBD** a **CBG** byly připraveny syntetickou cestou (99 % čistota) a společně s **CBD-E** a **CBG-E** extrakty (Hemp Flavouring Preparation (THC-Free) – 50 % CBD type, CSF2019/021-I; Hemp Flavouring Preparation (THC-Free) – 50 % CBG type, CSF2019/020) dodány firmou CBDepot s.r.o. (Teplice, Česká republika).

**CBD-E složení:** CBD 47,00–49,00 % (w), kanabidivarin (CBDV) 0,30–0,70 %, CBD-C4 0,05–0,20 %, CBG 1,00–2,00 %, CBG-C3 0,01–0,35 %, CBG-C4 0,01–0,02 %, CBC 0,01–0,02 %, CBN <0,005 %,  $\Delta^9$ -THC <0,005 mg/g směsi.

**CBG-E složení:** CBG 47,00–49,00 % (w), CBG-C3 0,50–1,50 %, CBG-C4 0,05–1,00 %, CBD 0,05–5,00 %, kanabidivarin (CBDV) 0,00–0,07 %, CBD-C4 0,00–0,02 %, CBN <0,005 %,  $\Delta^9$ -THC <0,04 mg/g směsi. **CBC** a **CBN** byly syntetizovány dle již dříve zavedeného protokolu [81]. Chlorhexidin diglukonát (C9394) byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

### **Kultivační médium**

Wilkins-Chalgren agar (WCHA; HiMedia, Bombaj, Indie), se 7 % ovčích erytrocytů a vitamínem K (0,001 mg/ml) byl použit pro kultivaci všech mikrobů vyjma laktobacilů. MRS agar (Oxoid, Basingstoke, UK) byl použit pro kultivaci laktobacilů.

Pro *S. mutans* a *P. gingivalis* byla použita mozko-srdcová infuze (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) obohacená vitamínem K (0,001 mg/ml) a heminem (5 mg/ml) – BHI+kh.

Pro *L. casei*, *L. acidophilus*, *E. corrodens*, *A. actinomycetecomitans* byla použita mozko-srdcová infuze (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK).

Citlivost vybraných mikrobů k testovaným substancím byla ověřena modifikací mikrodiluční metody dle Clinical and Laboratory Standards Institute [173]. Po sérii optimalizačních pokusů bylo v případě *P. gingivalis* Brucella growth medium nahrazeno BHI+kh pro lepší růst kultury [90].

### **Ředění extraktů**

Z jednotlivých extraktů a substancí byly ředěním v dimethylsulfoxidu (DMSO) připraveny základní pracovní roztoky. Tyto pracovní roztoky pak byly dále ředěny příslušným kultivačním tekutým médiem tak, aby podíl DMSO byl minimálně 1:100 a neinhiboval tak růst mikrobů. Sériovým ředěním, ředící faktor 1:2., pak byly připraveny požadované koncentrace jednotlivých substancí. Následně bylo 135  $\mu$ l každého ředění napipetováno do příslušných jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky z tvrzeného polystyrenu s kulatým dnem (Gamma Group a.s., České Budějovice, Česká republika).

### **Příprava inokula**

Z čerstvých kultur testovaných kmenů na WCHA event. MRS agaru, byly připraveny suspenze v BHI/BHI+kh. Jednotlivé jamky s naředěnými extrakty byly inokulovány 15  $\mu$ l připraveného inokula tak, aby výsledná koncentrace bakteriálních buněk byla  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

V případě *S. mutans* (24 hod.) (Obr. 12) a *P. gingivalis* (60 hod.) (Obr. 11) probíhala inkubace v Anaerobic Work Station (Ruskinn Technology, York, UK) s anaerobní atmosférou (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> a 10 % H<sub>2</sub>) při 37 °C. Ostatní mikroby byly inkubovány při 37 °C v inkubátoru CO<sub>2</sub> (Sanyo, Moriguchi, Japonsko) v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 48 hod.

## **Metodika hodnocení**

V jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky byl sledován růst mikroba, který se projevil zákalem média nebo jako sediment na dně jamky mikrotitrační destičky. Při inhibici růstu mikroba zůstalo médium čiré, bez viditelné sedimentace nebo zákalu.

Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena jako nejnižší koncentrace příslušné substance, při které nebyl pozorovaný růst mikroba.

Stanovení MIC jednotlivých substancí bylo u testovaných mikrobů provedeno ve třech nezávislých experimentech, v každém se třemi opakováními.

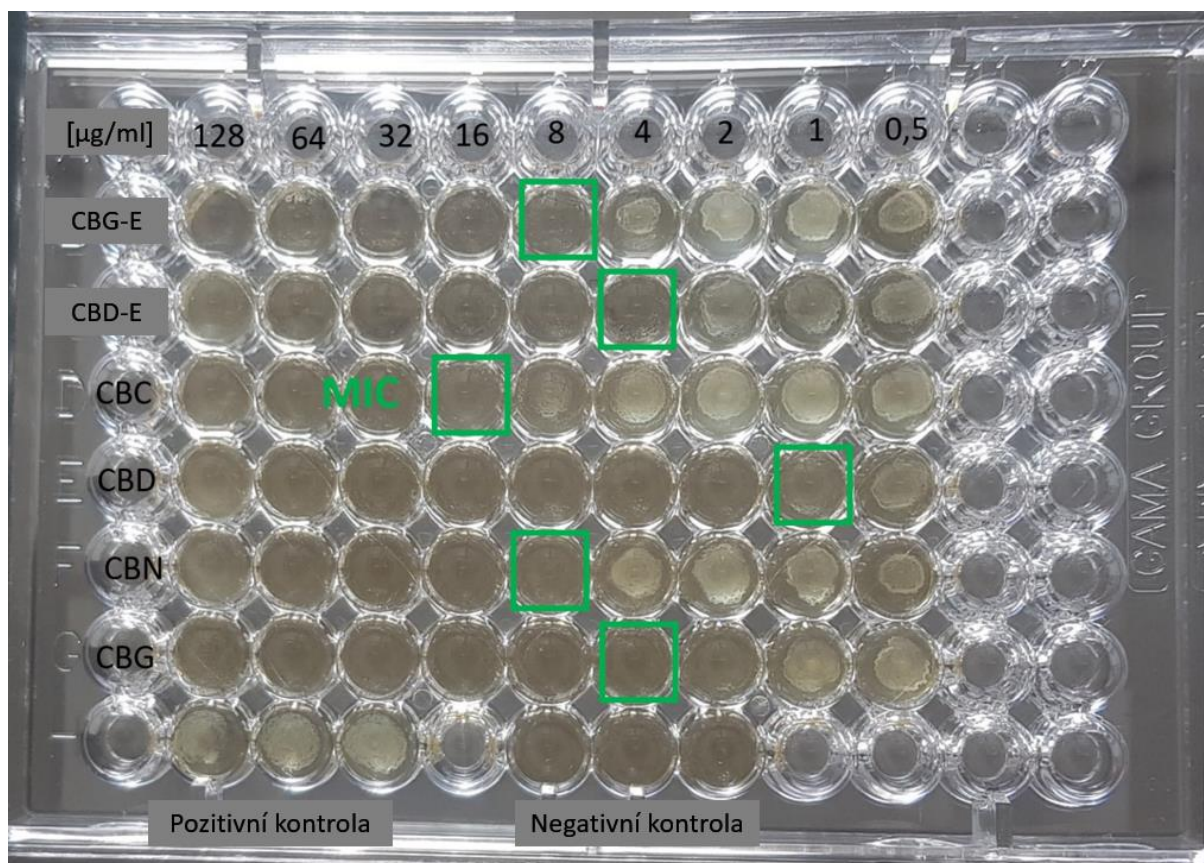
## **Kontrola sterility média a kontrola růstu**

Sterilita média byla kontrolována přenesením 150  $\mu$ l BHI/BHI+kh do tří jamek mikrotitrační destičky. Tři jamky na příslušné destičce obsahující pouze 135  $\mu$ l BHI/BHI+kh a 15  $\mu$ l připraveného inokula sloužily jako kontrola růstu u příslušných testovaných mikrobů.

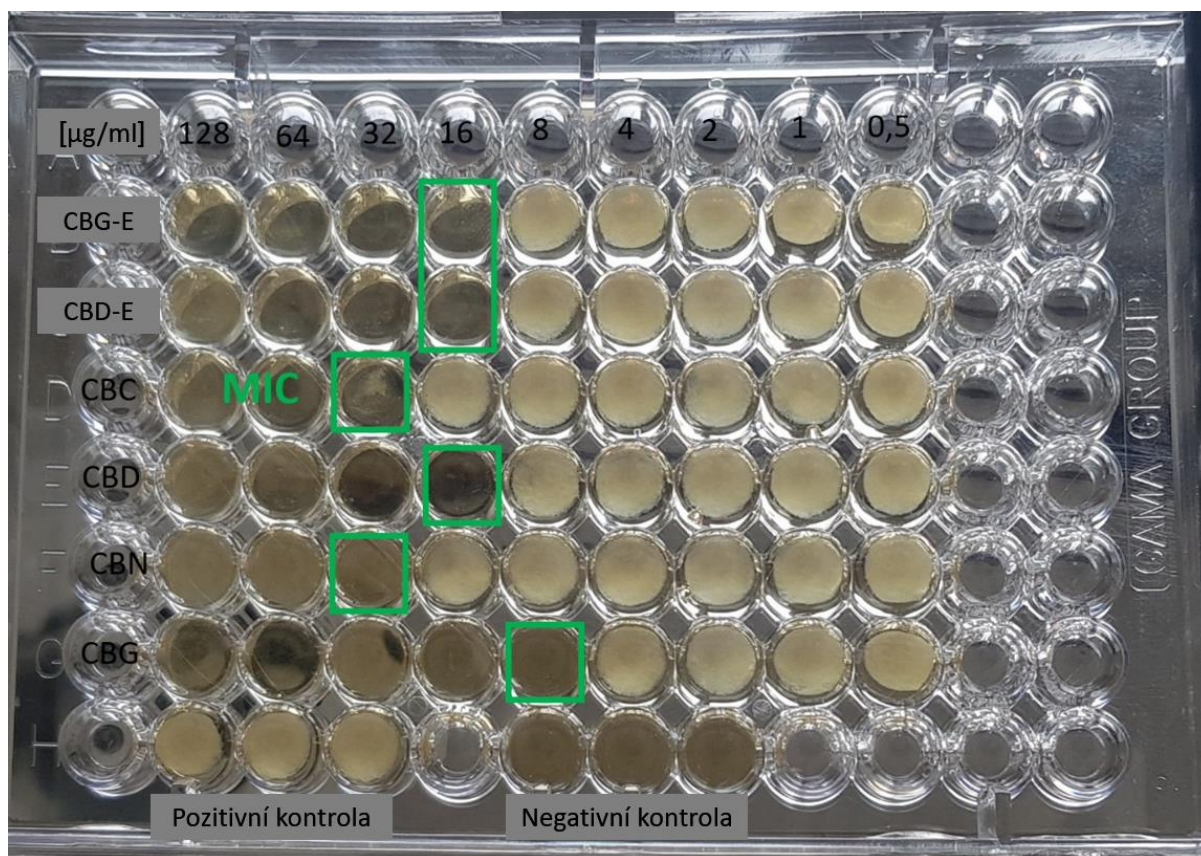
## **Kontrola kontaminace**

Po odečtu MIC byl obsah jamek s nejvyšší koncentrací příslušné substance a s viditelným mikrobiálním růstem vyočkován na WCHA. Stejně bylo vyočkováno samotné inokulum. Po 48 hod. (*S. mutans*) či 14 dnech (*P. gingivalis*) inkubace v anaerobní atmosféře byla hodnocena čistota narostlé mikrobiální kultury. U ostatních testovaných mikrobů probíhala inkubace s 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 48 hod. Přítomnost dalšího mikroba byla hodnocena jako kontaminace a výsledek byl považovaný za nevalidní.

**Kultivace mikroorganismů a měření MIC bylo provedeno ve spolupráci s prof. MUDr. Filipem Růžičkou, Ph.D. a Danielem Diabelkem - Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno.**



**Obr. 11: MIC *P. gingivalis*.** Foto: prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno.

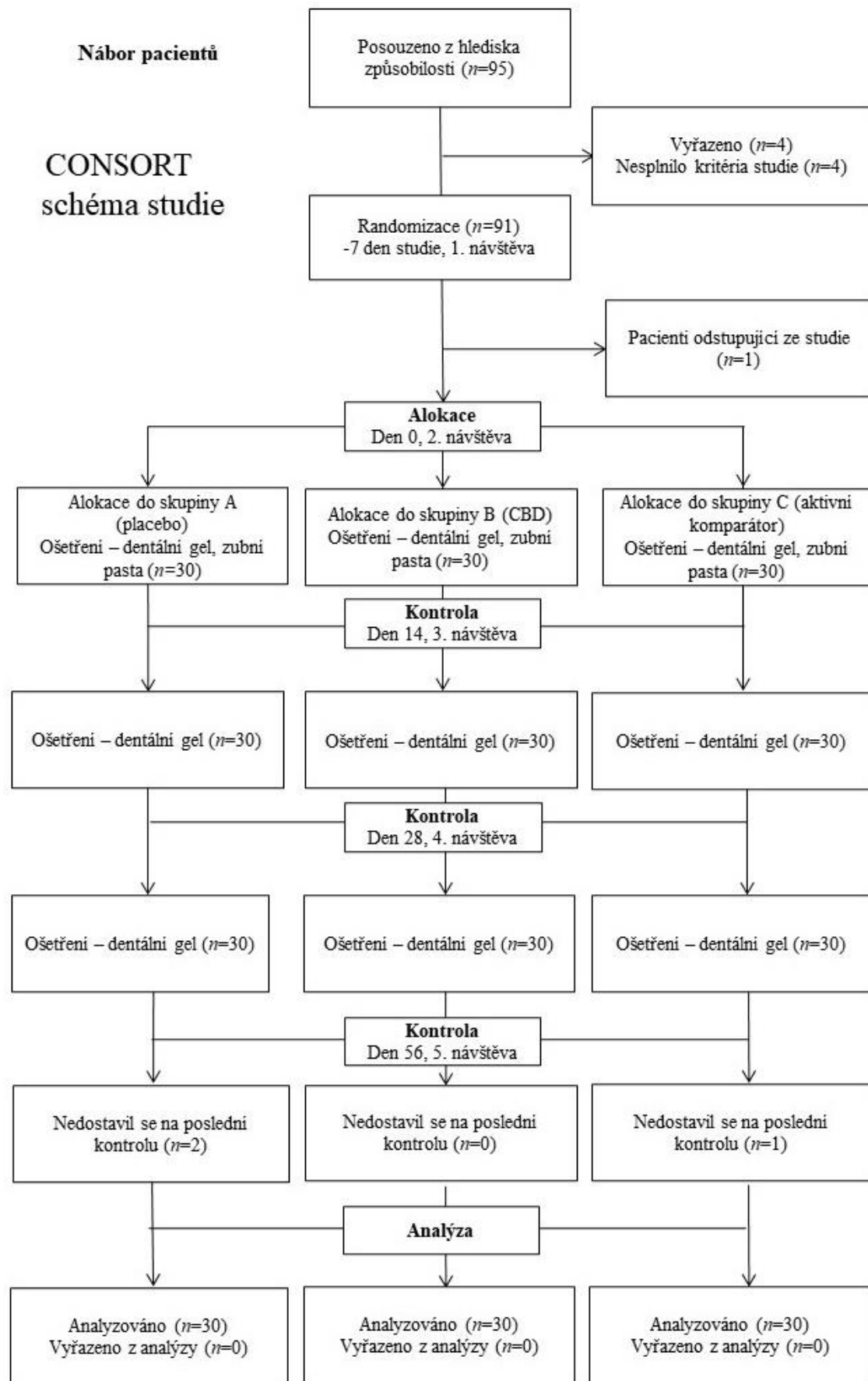


**Obr. 12: MIC *S. mutans*.** Foto: prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D. Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno.

#### **4. *Klinická studie***

##### **4.1. *Design klinické studie***

Studie byla provedena na základě souhlasu Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc (číslo jednací: 36/20) a registrovaná v mezinárodní databázi ClinicalTrials.gov pod identifikátorem (NCT05498012). Tato randomizovaná placebem kontrolovaná studie byla provedena v souladu se směrnicemi Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) [174] a Helsinskou deklarácí z roku 1975, revidovanou v roce 2013 [175]. CONSORT diagram studie je uveden na (Obr. 13).



Obr. 13: CONSORT schéma.



#### 4.1.1. Studovaná populace

Nábor pacientů (Tab. 6) probíhal od listopadu 2020, studie byla ukončena v únoru 2022. Jednalo se o subjekty z řad pacientů Kliniky zubního lékařství Fakultní nemocnice Olomouc.

Proměnné <sup>a</sup>	Skupina A (n=30)	Skupina B (n=30)	Skupina C (n=30)	p-hodnota
Věk (roky)	52 ± 8 (36–65)	55 ± 8 (36–65)	51 ± 10 (36–65)	0.833 <sup>b</sup>
Počet zubů	25 ± 2,5	25 ± 2,6	25 ± 2,7	1.000 <sup>b</sup>
Pohlaví (ženy %)	53	60	57	0.963 <sup>c</sup>

**Tab. 6: Charakteristika pacienta.** <sup>a</sup>průměr ± SD (rozmezí); <sup>b</sup>ANOVA; <sup>c</sup>Fisherův přesný test.

#### 4.1.2. Vstupní kritéria

Muži a ženy ve věku 35–65 let s počtem vlastních zubů  $\geq 16$  a diagnózou parodontitis chronica, kteří podepsali informovaný souhlas.

#### 4.1.3. Vylučovací kritéria

Chronická onemocnění (diabetes mellitus, onkologické onemocnění), zvýšená krvácivost (medikace - antikoagulancia, antiagregancia; hemoragické diatézy), těhotné a kojící ženy, kuřáci, uživatelé konopí či konopných produktů, systémová ATB v posledních 3 měsících, paralelní účast na jiné klinické zkoušce, celkový počet stálých prořezaných zubů menší než 16 (min. 4/kvadrant), pacient se snímatelnou náhradou, pacient s ortodontickým aparátem, mentální hendikep.

#### 4.1.4. Odhad velikosti vzorku

Na základě pilotního měření jsme předpokládali změny parodontálních indexů ve třech nezávislých skupinách (např. průměrná změna (0–7 dní) ve skupině A - snížení indexu MGI o 0,08, ve skupině B snížení o 0,2, ve skupině C snížení indexu MGI v průměru o 0,08), směrodatnou odchylku měření 0,14, RMSSE (root-mean-square standardized effect) = 0,495. Předpokládali jsme type I error rate ( $\alpha$ ) = 0,05 a sílu testu (power) = 0,8. Požadovaná velikost vzorku za těchto podmínek je minimálně 21 pacientů v každé skupině (Tab. 7). Kvůli předpokládanému použití neparametrických metod byla velikost vzorku navýšena o 10 %. Do každé skupiny je třeba nabrat minimálně 23 pacientů. Vzhledem k předpokládanému odstoupení části pacientů ze studie bylo nakonec rekrutováno a alokováno 90 pacientů, 30 do každé skupiny.

	Jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA)
	Hodnota
Počet skupin	3,0000
RMSSE	0,4949
Type I Error Rate (Alpha)	0,0500
Power Goal	0,8000
Actual Power for Required N	0,8063
<b>Vyžadovaná velikost vzorku (N)</b>	<b>21,0000</b>

**Tab. 7: Odhad velikosti vzorku.** Spočítáno programem TIBCO STATISTICA verze 13.4.0.14.

#### *4.1.5. Randomizace, sběr a zpracování dat*

Pro zařazení do studie byl potřebný podepsaný informovaný souhlas pacienta. Informace o průběhu studie byly pacientovi sděleny ústně i písemně. Po splnění vstupních kritérií byli pacienti zařazeni do studie a bylo jim přiděleno identifikační číslo. Zařazení do skupiny A, B nebo C bylo provedeno pomocí randomizace (velikost bloku – 30 pacientů). Člen personálu, který se nepodílel na vyšetření nebo léčbě pacientů, předal pacientům postupně očíslované nádoby se zkoumanými přípravky. Složení placebo dentálního gelu/zubní pasty bylo vyrobeno tak, aby co nejvíce připomínalo CBD gel/zubní pastu a pozitivní kontrolu Corsodyl gel. Všechny zubní pasty a gely byly baleny v identických lahvičkách. Účastníci i zkoušející byli zaslepeni ohledně skupiny. Jakmile byla studie dokončena a soubor dat byl uzamčen, došlo k odtajnění označení zubních past/gelů.

#### **4.1.6. Složení dentálních gelů a past**

Skupina A (placebo): Placebo dentální gel (bez CBD): Karbomer, Glycerin, Skvalan, konzervant, Voda. Placebo zubní pasta (bez CBD): Sorbitol, Glycerin, Silica, Xylitol, Capryloyl/Caproyl Methyl Glucamid, Lauroyl/Myristoyl Methyl Glucamid, PEG-2, IPM, Hydroxyethylcellulose, Xanthanová guma, konzervant, Voda.

Skupina B (CBD skupina): CBD dentální gel: Karbomer, Glycerin, Skvalan, konzervant, Voda, CBD = kanabidiol (1.00 %). CBD zubní pasta: Sorbitol, Glycerin, Silica, Xylitol, Capryloyl/Caproyl Methyl Glucamid, Lauroyl/Myristoyl Methyl Glucamid, PEG-20, IPM, Hydroxyethylcellulose, Xanthan Gum, konzervant, Voda, CBD = kanabidiol (1.00 %).

Skupina C (aktivní komparátor): Corsodyl 1 % chlorhexidine digluconate dentální gel (GlaxoSmithKline). Placebo zubní pasta: Sorbitol, Glycerin, Silica, Xylitol, Capryloyl/Caproyl Methyl Glucamid, Lauroyl/Myristoyl Methyl Glucamid, PEG-20, IPM, Hydroxyethylcellulose, Xanthanová guma, konzervant, Voda. Všechny dentální gely a pasty ve variantách placebo a CBD byly připraveny firmou CB21 Pharma s.r.o. (Brno, Česká republika).

#### **4.1.7. Primární a sekundární cíle klinické studie**

Primárním cílem bylo prověřit účinek CBD na hodnoty následujících hygienických, gingiválních a parodontálních indexů: Russellův parodontální index (Russell's periodontal index - PI) [176], plakový index (plaque index - PLI), gingivální index (gingival index - GI) [177-179], index krvácivosti gingivy (gingival bleeding index - GBI) [180] a modifikovaný gingivální index (modified gingival index - MGI) [181].

Sekundárním cílem bylo hodnotit antimikrobiální působení CBD na vybrané periopatogenní bakterie (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* sp.).

#### 4.1.8. Léčebný protokol

##### Při 1. návštěvě (den -7)

- 1) Odběr anamnézy (osobní, farmakologická a alergologická anamnéza – dle vstupních/vylučovacích kritérií).
- 2) Zhotovení OPG snímku.
- 3) Russellův parodontální index.
- 4) Odběr sulkulární tekutiny z parodontálního chobotu pro mikrobiologickou analýzu (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *Capnocytophaga* sp.).
- 5) Odstranění zubního kamene (ultrazvuk) a plaku, výplach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 6) Odběr vzorku gingivy k histopatologickému vyšetření.
- 7) Hygienická instruktáž – předání sady na ústní hygienu.

Pacientovi, který splňoval kritéria pro přijetí do studie, byl odebrán vzorek sulkulární tekutiny z parodontálního chobotu k detekci periopatogenů, odstraněn zubní kámen a plak a vypláchnuty parodontální choboty 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Byl odebrán vzorek gingivy k histopatologickému vyšetření. Dále byl pacient seznámen s technikou správného čištění zubů zubním/mezizubním kartáčkem (2x denně po dobu nejméně 3 min.). Pacient obdržel zubní kartáček Curaprox Supersoft a sadu mezizubních kartáčků Curaprox.

##### Při 2. návštěvě (den 0)

- 1) Alokace pacientů do skupin (skupina A, B, C).
- 2) Russellův parodontální index (Russell's periodontal index - PI) [176], plakový index (plaque index - PLI), gingivální index (gingival index - GI) [177-179], index krvácivosti gingivy (gingival bleeding index - GBI) [180] a modifikovaný gingivální index (modified gingival index - MGI) [181].
- 3) Aplikace CBD gelu/placeba/chlorhexidin gelu do chobotů a na gingivu (5 min. působení).

- 4) Předání 2 kusů zubních past (2x75 ml) obsahujících CBD/placebo.

Evaluační dodržování ústní hygieny a diagnostika onemocnění parodontu parodontálním indexem, indexy krvácivosti, a plakovým indexem. Proběhla aplikace gelu dle skupiny do parodontálních chobotů (doba působení 5 minut).

### **Při 3. návštěvě (den 14)**

- 1) Indexy – PI, PLI, GI, GBI, MGI.
- 2) Aplikace CBD gelu/placeba/chlorhexidin gelu do chobotů a na gingivu (5 min. působení).

Byla provedena diagnostika onemocnění parodontu parodontálním indexem, indexy krvácivosti, a plakovým indexem. Proběhla aplikace gelu dle skupiny do parodontálních chobotů (doba působení 5 minut).

### **Při 4. návštěvě (den 28)**

- 1) Indexy – PI, PLI, GI, GBI, MGI.
- 2) Odběr sulkulární tekutiny z parodontálního chobotu pro mikrobiologickou analýzu (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *Capnocytophaga* sp.).
- 3) Odběr vzorku gingivy k histopatologickému vyšetření.
- 4) Aplikace CBD gelu/placeba/chlorhexidin gelu do chobotů a na gingivu (5 min. působení).

Byla provedena diagnostika onemocnění parodontu parodontálním indexem, indexy krvácivosti a plakového indexu. Byl odebrán vzorek sulkulární tekutiny z parodontálního chobotu k detekci periopatogenů a vzorek gingivy k histopatologickému vyšetření.

### **Při 5. návštěvě (den 56)**

- 1) Indexy – PI, PLI, GI, GBI, MGI.
- 2) Odběr sulkulární tekutiny z parodontálního chobotu pro mikrobiologickou analýzu (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micra*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *Capnocytophaga* sp.)

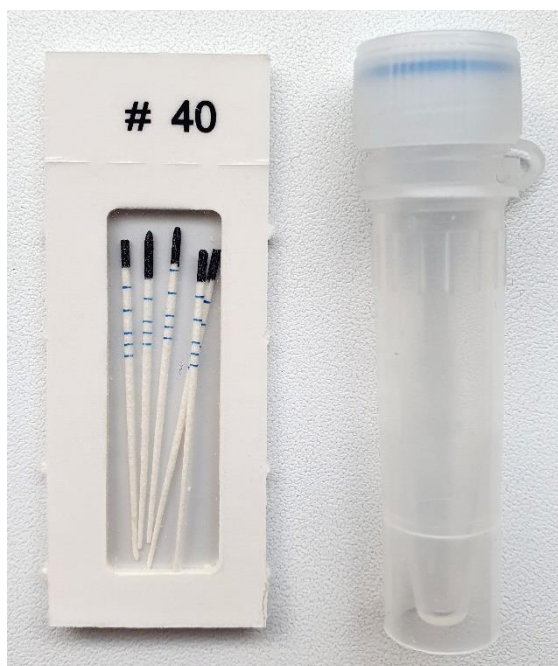
Celková délka léčby byla stanovena na 56 dní.

Všechny klinické parametry byly měřeny zaslepeným a kalibrovaným hodnotitelem.

Všem pacientům byla po ukončení studie poskytnuta standardní parodontologická léčba.

## Praktický postup odběru mikrobiologického vzorku

Odběrové místo bylo izolováno vatovými tampóny. Následně byl pomocí sterilní pinzety na dno každého z pěti nejhlubších parodontálních chobotů zasunut sterilní papírový čep, který zde byl ponechán po dobu 15 sekund. Poté se čepy (Obr.14) s odebranými vzorky nechaly 15 minut sušit na sterilní gáze a byly vloženy do zkumavky a odeslány do laboratoře k analýze.



**Obr. 14: Sterilní papírové čepy s transportní nádobou.**

Vysušené vzorky jsou stabilní během běžného transportu kurýrní službou nebo poštou (tzn. asi 14 dní). Krátkodobě lze stabilitu vzorku zvýšit uložením při 4 °C. Dlouhodobě je nutné vzorky skladovat při -20 °C.

Z odebraných vzorků byla po příjmu v laboratoři izolována DNA za využití kitu Exiprep Plus Bacteria Genomic DNA kit (Bioneer s.r.o, Oakland, CA, USA) v automatickém izolátoru Exiprep 16 Plus (Bioneer s.r.o, Oakland, CA, USA).

Detekce bakteriální DNA probíhala pomocí metodiky VariOr® Dento (GEN-TREND s.r.o., Rudolfov, Česká republika). Principem je amplifikace specifických 16S rDNA úseků periopatogenních bakterií pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) za využití DIG-UTP značených oligonukleotidů (Roche, Basilej, Švýcarsko). Následně je provedena reverzní hybridizace pomocí robotického hybridizátoru AutoBlot 3000 (MEDTEC, Hillsborough, NC, USA): DIG-UTP značený PCR produkt je navázán na membránu se specifickými sondami pro jednotlivé bakterie a následně vizualizován pomocí chemiluminiscence. Výsledný signál je snímán za využití detekčního přístroje c300 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). Signály

pro jednotlivé bakterie jsou následně odečteny oproti kalibrační křivce, která je pro každý vzorek individuální. Citlivost dané metody je  $1 \times 10^3$  bakterií na 1  $\mu$ l sulkulární tekutiny.

### **Praktický postup odběru vzorku interdentalní papily pro histopatologické vyšetření.**

Po aplikaci infiltrační anestezie (Supracain 4%) byl z místa s nejvyšší hodnotou MGI odebrán vzorek interdentalní papily, který byl vložen do odběrové nádoby HistoFOR BFS-40 (Transportní kontejner s fixačním roztokem (40 ml), Složení: koncentrovaný formalín, upravená voda, fosfátový pufr. Specifikace: 10% pufrovaný formalín - obsah formaldehydu max. 4 %, pH 6,8–7,2, dodáno firmou Pro-Charitu s.r.o., Červený Kostelec, Česká republika) a následně odeslán do laboratoře k analýze.

Všechny vzorky lidské gingivy byly fixovány 10% formalínem a zality do parafínu. Byly provedeny řezy 4–5  $\mu$ m a obarveny hematoxylinem a eosinem. Nejprve jsme analyzovali morfologii získaných vzorků: kvalitu, přítomnost reaktivních změn epitelu, tvorbu eroze/vředu/nekrózy, bakteriální kolonie, stromální vzhled a intenzitu zánětlivých buněk. Pro následný imunohistochemický postup byly dodrženy protokoly výrobce. Sklíčka byla zbavena parafínu, dehydratována a vystavena teplem indukovanému získání antigenu. Řezy byly inkubovány se zředěnými primárními protilátkami a poté se sekundární protilátkou. Výsledky byly interpretovány pomocí standardního světelného mikroskopu. Nálezy byly ověřeny dvěma nezávislými patology z Kliniky klinické a molekulární patologie FN UP Olomouc, Česká republika (M.K, Z.K.), počítající CD3+ (T-lymfocyty; HPST-Dako, protilátkový klon F7.2.38, ředění 1:100, automated system UltraView DAB kit), CD20+ (B-lymfocyty; HPST-Dako, antibody clone L26, ředění 1:100, FLEX systém), CD68+ (makrofágy; HPST-Dako, antibody clone PG-M1, ředění 1:100, FLEX systém) a CD138+ (plazmocyty; HPST-Dako, antibody clone MI15, ředění 1:125, FLEX systém) imunitní buňky pomocí mikroskopu s velkým zvětšením ( $\times 400$ ). Navrhli jsme také stupnici zánětu podle počtu zánětlivých buněk na zorné pole s použitím velkého zvětšení ( $\times 400$ ). Intenzita zánětlivé odpovědi byla klasifikována jako minimální (počet imunitních buněk do 60 na zorné pole), mírná (počet analyzovaných imunitních buněk v rozmezí 61 až 100), střední (fokálně splývající vrstvy zánětlivých buněk v rozmezí 101 až 200) a těžké (splývající vrstvy zánětlivých buněk v počtu více než 200).

**Histopatologická analýza byla provedena ve spolupráci s MUDr. Mgr. Markétou Kolečkovou, Ph.D. Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc.**



#### **4.1.9. Statistická analýza**

Data byla prezentována pomocí průměru, směrodatné odchylky (SD), mediánu a minimální a maximální hodnoty. Byly provedeny Shapiro-Wilkovy testy normality. Pro veličiny s normální distribucí byly použity parametrické testy. Pro nezávislé vzorky byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s Bonferroniho korekcí nebo Dunnettovy post hoc testy. Pro závislá měření byla zvolena ANOVA s opakováním s následnými Bonferroniho post hoc testy. Pro veličiny s nenormální distribucí byly použity neparametrické obdoby těchto testů. Pro nezávislé vzorky Kruskal-Wallisova ANOVA s post hoc testy Dunnové a pro opakovaná měření (závislé vzorky) Friedmanův test s post hoc testy pomocí Wilcoxonových testů s Bonferroniho korekcí signifikance [182]. Kvalitativní znaky byly popsány pomocí absolutních a relativních četností. Závislá měření byla porovnána pomocí McNemarova testu symetrie, pro nezávislé vzorky byl použit Fisherův přesný test. Hodnota  $p < 0,05$  byla přijata jako hladina statistické významnosti pro všechny analýzy. Data byla zpracována pomocí software IBM SPSS Statistics for Windows, verze 23.0. Armonk, NY, IBM Corp.

**Statistické zpracování dat bylo provedeno ve spolupráci s Mgr. Kateřinou Langovou, Ph.D., Ústav lékařské biofyziky, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.**

## 4.2. Výsledky

### 4.2.1. Preklinická část

Preklinická část studie byla zaměřena na hodnocení antimikrobiální aktivity fytoKANABINOIDŮ *in vitro* na suspenzích *P. gingivalis*, *S. mutans* a dalších bakterií. Získaná preklinická data byla dále využita jako základ pro provedení klinické studie, která byla zaměřena na hodnocení účinku CBD na potlačení zánětu parodontu.

Na buněčných suspenzích *P. gingivalis* a *S. mutans* byla diluční metodou hodnocena MIC pro čtyři zástupce nepsychoTROPNÍCH fytoKANABINOIDŮ – CBD, CBN, CBC a CBG. Dále bych hodnocen antimikrobiální účinek komplexních směsí bohatých na CBD (CBD-E) a CBG (CBG-E). I přesto, že fytoKANABINOIDY vykazují antimikrobiální aktivity primárně vůči G-pozitivním bakteriím [90, 183], byla pozorována jednoznačná inhibice růstu u anaerobní G-negativní bakterie *P. gingivalis*, a to primárně po aplikaci CBD (Tab. 8). V případě *S. mutans*, který řadíme mezi G-pozitivní fakultativně anaerobní patogeny, vykazoval nejnižší hodnoty MIC CBG. Tato preklinická pozorování jsou v souladu se studií [184] a s experimenty provedenými s bakteriálními inokuly získanými z plaku odebraného jednotlivým subjektům po inkubaci s vybranými fytoKANABINOIDY. Bylo zjištěno, že fytoKANABINOIDY vykazují statisticky výrazně lepší antimikrobiální účinek než vybraní zástupci komerčních zubních past [167]. Stejní autoři publikovali studii, ve které srovnávali antimikrobiální efekt ústních vod obsahujících CBD nebo CBG s chlorhexidin glukonátem. Hodnocení ústních vod podle počtu kolonií ukázalo srovnatelný antimikrobiální účinek CBD/CBG s chlorhexidin diglukonátem [168]. U obou studií nebyly provedeny typizace bakteriálních izolátů a v některých experimentech byl srovnáván účinek fytoKANABINOIDŮ v roztoku s finálními prostředky ústní hygieny nikoliv s aktivními ingrediencemi těchto přípravků.

V případě našeho testování vzorků CBD-E a CBG-E byly pozorovány MIC v rozsahu 2–8 µg/ml (pro *P. gingivalis*) a MIC=16 µg/ml (pro *S. mutans*). CBD-E a CBG-E vzorky nevykazovaly synergické působení jednotlivých komponent. Naopak MIC samotného CBD u *P. gingivalis* byly srovnatelné s MIC, kterých jsme dosáhli pro CHX (Tab. 8). Námi pozorované MIC pro CHX se shodují s výsledky studie [185], kde byly popsány MIC pro *P. gingivalis* 2–4 µg/ml a *S. mutans* 1–2 µg/ml. V dalších experimentech jsme zaměřili pozornost na antibakteriální účinky CBD vůči *A. actinomycetemcomitans* a *E. corrodens*, které jsou etiologicky spojeny s parodontitis [106]. Do komparativního testování s CHX byly také vybrány *Lactobacillus* sp. [186]. U *L. casei* a *L. acidophilus* se MIC pro CBD blížily MIC pro CHX. Konkrétně pro *L. casei* byl CBD prakticky stejně účinný jako CHX (MIC=2–4 µg/ml). Pro *L. acidophilus* byla stanovena MIC pro CBD (4–8 µg/ml) a pro CHX (2–4 µg/ml). U ostatních mikrobů byla účinnost CBD v porovnání s CHX nižší. *A. actinomycetemcomitans* je inhibován v růstu významně lépe CHX (MIC=4 µg/ml) než v případě CBD (MIC>128 µg/ml). Podobně rozdíly vykazovalo antimikrobiální působení CBD (MIC=16–32 µg/ml) a CHX (MIC=2–4 µg/ml) u *E. corrodens*.

Testovaná látka/extrakt	<i>P. gingivalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. corrodens</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
CBG-E	4–8	16	-	-	-	-
CBD-E	2–4	16	-	-	-	-
CBC	16	32	-	-	-	-
CBD	1–2	16	16–32	>128	4–8	2–4
CBN	8	32	-	-	-	-
CBG	4	8	-	-	-	-
CHX	1	1–2	2–4	4	2–4	2–4

**Tab. 8: MIC hodnoty (µg/ml) testovaných fytokannabinoidů a extraktů (CBD-E a CBG-E) ve srovnání s chlorhexidinem (CHX).**

#### 4.2.2. *Klinická část*

Pacienti byli rekrutováni monocentricky ve třech skupinách. Vstupní a vylučovací kritéria jsou uvedena v sekci 4.1.2 a 4.1.3., CONSORT diagram studie je znázorněn na (Obr. 13). Pacienti užívali bez omezení na denní bázi po dobu 56 dní placebo zubní pastu bez obsahu CBD (skupina A,  $n = 30$ ) a s obsahem 1 % *w/w* CBD (skupina B,  $n = 30$ ). Obě skupiny byly během studie v rámci kontrolní návštěvy třikrát ošetřeny dentálním gelem bez (skupina A) a s obsahem 1 % *w/w* CBD (skupina B). Dentální gel byl aplikován do parodontálních chobotů po ultrazvukovém odstranění zubního kamene. Třetí skupina užívala placebo zubní pastu a byla ošetřena dostupným preparátem dentální gel Corsodyl s obsahem 1 % *w/w* chlorhexidin diglukonátu (aktivní komparátor, skupina C,  $n = 30$ ). Ve čtyřech časových intervalech byly hodnoceny parodontologické a hygienické indexy, Russelův parodontální index (Russell's periodontal index, PI) [176], plakový index (plaque index, PLI), gingivální index (gingival index, GI) [177-179], index krvácivosti gingivy (gingival bleeding index, GBI) [180] a modifikovaný gingivální index (modified gingival index, MGI) [181].

Russelův parodontální index nevykazoval změny v průběhu studie, naopak změny byly pozorovány pro zbývající sledované indexy (Tab. 9).

<b>PLI</b>	Skupina A (n = 30)	Skupina B (n = 30)	Skupina C (n=30)
Den 0	0,65±0,25	0,73±0,32	0,75±0,37
Den 14	0,54±0,22	0,66±0,32	0,59±0,25
Den 28	0,55±0,20	0,54±0,33	0,57±0,29
Den 56	0,62±0,24	0,60±0,35	0,56±0,32

<b>MGI</b>	Skupina A (n = 30)	Skupina B (n = 30)	Skupina C (n=30)
Den 0	0,87±0,25	1,09±0,30	0,95±0,30
Den 14	0,78±0,25	0,89±0,32	0,87±0,27
Den 28	0,79±0,25	0,74±0,29	0,82±0,27
Den 56	0,80±0,22	0,74±0,31	0,80±0,26

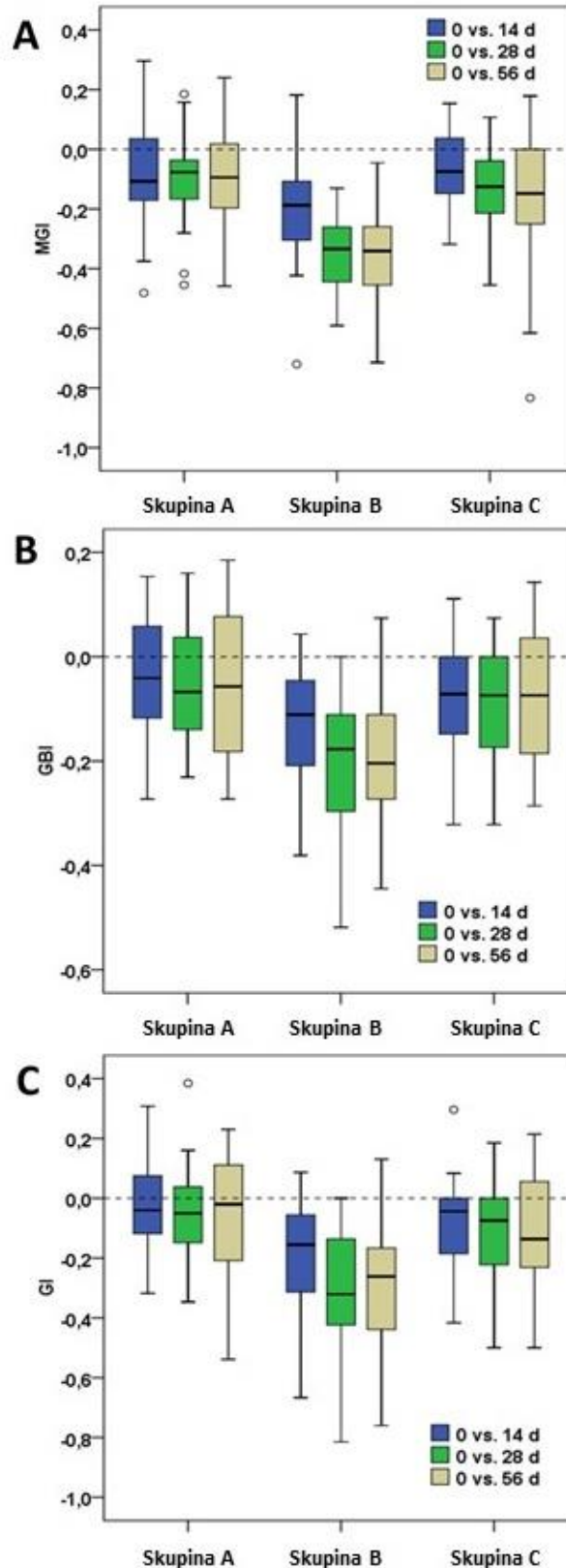
<b>GBI</b>	Skupina A (n = 30)	Skupina B (n = 30)	Skupina C (n=30)
Den 0	0,44±0,14	0,51±0,18	0,45±0,14
Den 14	0,40±0,14	0,38±0,15	0,37±0,12
Den 28	0,38±0,14	0,30±0,16	0,36±0,10
Den 56	0,40±0,12	0,31±0,16	0,37±0,13

<b>GI</b>	Skupina A (n = 30)	Skupina B (n = 30)	Skupina C (n=30)
Den 0	1,33±0,20	1,42±0,25	1,37±0,22
Den 14	1,30±0,20	1,23±0,25	1,28±0,22
Den 28	1,28±0,19	1,11±0,28	1,24±0,20
Den 56	1,30±0,17	1,12±0,30	1,26±0,21

<b>PI</b>	Skupina A (n = 30)	Skupina B (n = 30)	Skupina C (n=30)
Den -7	3,66±1,51	4,59±1,46	3,96±1,70
Den 0	3,62±1,53	4,57±1,48	3,92±1,73
Den 14	3,58±1,57	4,55±1,50	3,89±1,76
Den 28	3,57±1,57	4,53±1,53	3,87±1,78
Den 56	3,57±1,50	4,51±1,53	3,92±1,79

**Tab. 9. Změny ve sledovaných indexech v průběhu studie:** Russellův parodontální index (PI), plakový index (PLI), gingivální index (GI), index krvácivosti gingivy (GBI) a modifikovaný gingivální index (MGI). Hodnota ± SD. Data jsou dále znázorněna na Grafu 2.

**Hodnocení indexů – GBI:** 0–1 = 0–100 %. **GI:** 0,1–1 (mírný zánět); 1,1–2 (střední zánět); 2,1–3 (těžký zánět). **MGI:** 0,1–1 (mírný zánět); 1,1–2 (střední zánět); 2,1–3 (těžký zánět). **PI:** 0,3–0,9 (gingivitis); 1,0–1,9 (počátek destruktivního onemocnění parodontu); 2,0–4,9 (etablované destruktivní onemocnění parodontu); 5,0–8,0 (terminální onemocnění parodontu). **PLI:** 0 (výborná hygiena); 0,1–0,9 (dobrá); 1,0–1,9 (uspokojivá); 2,0–3,0 (špatná).



**Graf 2: Hodnocení klinických dat.** Krabicové grafy (A) modifikovaného gingiválního indexu – MGI, (B) indexu krvácivosti gingivy – GBI a (C) gingiválního indexu – GI pro skupiny A, B, C.

Graficky bylo rozdělení hodnot znázorněno krabicovými grafy (Graf 2). Vodorovná čára v krabici znázorňuje hodnotu mediánu, dolní hrana krabice hodnotu 1. kvartilu (25. percentilu), horní hrana hodnotu 3. kvartilu (75. percentilu). Svorky ukazují maximální a minimální naměřené hodnoty. Odlehlé (hodnoty, které jsou od kvartilů vzdáleny více než 1,5násobek mezikvartilového rozpětí) jsou zakresleny kroužky. Ve všech skupinách došlo k poklesu hodnot plakového indexu PLI. Friedmanův test prokázal statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými -7, 0, 28 a 56. den u všech skupin: skupina A,  $p = 0,022$ , skupina B:  $p < 0,0001$  a skupina C:  $p = 0,001$ .

Signifikantní změny byly pozorovány pro GI, GBI a MGI. Pro MGI, byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami v hodnotách naměřených v den 0 a ve změnách MGI, které nastaly v sledovaných obdobích při  $p < 0,05$  (Graf 2A). Post hoc testy mnohonásobného porovnání skupin mezi sebou ukázaly, že 0. den měli nejvyšší hodnoty MGI pacienti s CBD, lišili se významně od pacientů ve skupině A a C. Největší snížení hodnot MGI nastalo u skupiny B. Změny, které nastaly ve všech sledovaných obdobích u pacientů s CBD, byly statisticky významně vyšší než u pacientů s placebem nebo u skupiny C. Pacienti spadající do skupin A nebo C se ve změnách nelišili. Friedmanův test prokázal statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými 0, 28 a 56 den u skupiny A:  $p = 0,003$ , skupiny B:  $p < 0,0001$  a skupiny C:  $p = 0,0003$ . U všech skupin byly 56. den zjištěny statisticky významně nižší hodnoty než v den 0.

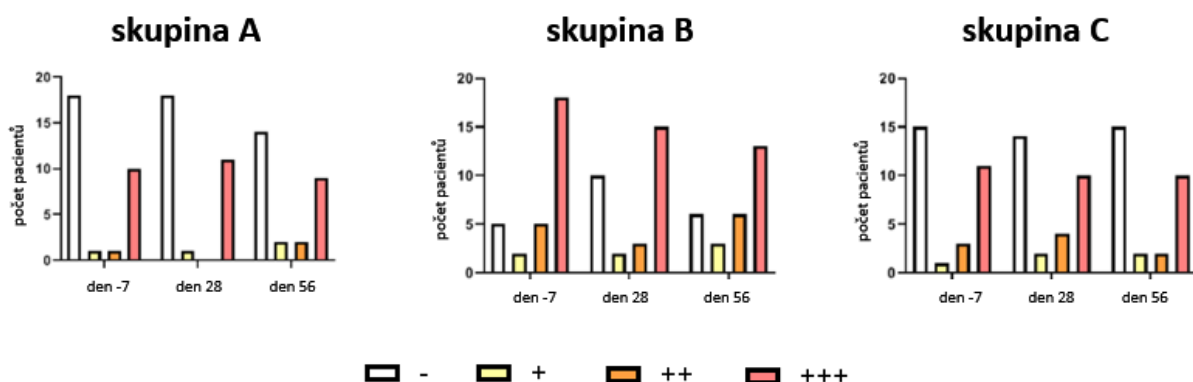
Pro GBI, Kruskal-Wallisovou ANOVOU byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami v hodnotách naměřených v den 28 ( $p = 0,023$ ) a 56 ( $p = 0,006$ ). U pacientů s CBD byly významně nižší hodnoty než u pacientů s placebem (Graf 2B). Post hoc testy ukázaly, že změny, které nastaly u pacientů ze skupiny B, byly větší než změny, které nastaly u ostatních skupin. ANOVA s opakováním prokázala statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými 0, 28 a 56 den u skupiny A:  $p = 0,047$ , skupiny B:  $p < 0,0001$  a skupiny C:  $p < 0,0001$ . Signifikantní snížení hodnot GBI mezi den 0 vs. den 56 pro placebo prokázáno nebylo, bylo ovšem prokázáno u skupin B ( $p < 0,0001$ ) a C ( $p = 0,009$ ).

Pro GI, byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinami v hodnotách naměřených v den 28 ( $p = 0,016$ ) a 56 ( $p = 0,011$ ) (Graf 2C). U skupiny B byly významně nižší hodnoty než u pacientů ve skupině A. Byly prokázány rozdíly ve změnách GI, které nastaly v sledovaných obdobích,  $p < 0,05$  u všech testů. Bonferroniho post hoc testy ukázaly, že změny, které nastaly u pacientů ze skupiny B, byly větší než změny, které nastaly u ostatních skupin. ANOVA s opakováním prokázala statisticky významné rozdíly mezi hodnotami naměřenými 0, 28 a 56 den jen u skupin B a C. U pacientů ve skupině A nedošlo v čase ke

změnám indexu GI. U pacientů skupiny B se v čase hodnoty indexu GI snižovaly,  $p < 0,0001$ , stejně tak u pacientů skupiny C ( $p = 0,001$ ).

Po hodnocení indexů byla na tkáňové úrovni u všech subjektů potvrzena přítomnost zánětu. Vzorek gingivální tkáně byl odebírán z interdentalní papily v místě s nejhlubším paradontálním chobotem. Odběry byly provedeny v den -7 a 28 a sloužily primárně pro potvrzení diagnózy. V tkáňových řezech bylo hodnoceno to, zda se jedná o zánět chronický, zánět exacerbuující, zánět hnisavý, nekrózu, výskyt bakterií, přítomnost reaktivní atypie sliznice a parametr eroze v případě přítomnosti epitelální tkáně. Intenzita zánětu byla hodnocena na základě počtů plazmocytů, T-lymfocytů, B-lymfocytů a makrofágů. Ve skupině B byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi odběrem v čase den -7 a 28 pouze v parametru eroze,  $p = 0,039$ , což ovšem koresponduje s místem odběru a nereflakuje celkové změny zánětu.

Mikrobiologické odběry proběhly v čase -7, 28 a 56. Statisticky významné rozdíly byly pouze u bakterie *Eubacterium nodatum* u všech skupin pacientů (skupina A:  $p = 0,036$ ; skupina B:  $p = 0,040$ ; skupina C:  $p = 0,024$ ). Ve skupině A a C nebyl významný rozdíl mezi počtem bakterií v den -7 a 56. Ke snížení došlo pouze mezi den -7 a 28. Ve skupině B byl nejvyšší počet bakterií v den -7, pak se významně snížil a zůstal na stejné úrovni. Byly pozorovány klesající trendy pro výskyt *P. gingivalis* u skupiny B na rozdíl od dvou kontrolních skupin (Graf 3). Ukázka výsledků mikrobiologické analýzy je uvedena na (Obr. 15).



**Graf 3: Výsledky mikrobiologického vyšetření pro *Porphyromonas gingivalis*. Více dat k dispozici v grafu 4 a 5.**







Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	+++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	++
	<i>Treponema denticola</i>	Td	+++
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	+++
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	--
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	+++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	--
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	++
Rezistence k β-laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		<b>Vysoké</b>	

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	+
	<i>Treponema denticola</i>	Td	++
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	+
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	+++
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	--
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	+++
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	--
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	+
Rezistence k β-laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		<b>Vysoké</b>	

Komplex	Patogeny	Zkratka	Nález
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Aa	--
Červený	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	++
	<i>Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)</i>	Tf	--
	<i>Treponema denticola</i>	Td	++
Oranžový	<i>Parvimonas micra</i>	Pm	++
	<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	+++
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	++
Asociován s oranž.	<i>Campylobacter rectus</i>	Cr	--
	<i>Eubacterium nodatum</i>	En	--
Zelený	<i>Eikenella corrodens</i>	Ec	--
	<i>Capnocytophaga sp.</i>	Cs	+
Rezistence k β-laktamovým ATB			-
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		<b>Střední</b>	

**Legenda:** (-) nedetekován, odpovídá počtu bakterií  $<10^3$       (+) slabě pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $10^3 - 10^4$       (++) středně pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $10^4 - 10^5$       (+++) silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $>10^5$

bez rizika      nízké riziko  
střední riziko      vysoké riziko

**Obr. 15: Výsledky amplifikace specifických 16S rDNA úseků periopatogenních bakterií pomocí PCR, ukázka výsledků od pacienta ze skupiny B z 1., 2. a 3. odběru mikrobiologického vzorku.**

## **5. Souhrn poznatků disertační práce**

Pro hodnocení protizánětlivého účinku CBD v dutině ústní sehrává klíčovou úlohu nejenom jeho působení na tkáň parodontu, ale také interakce CBD s orálním mikrobiomem. Uvedené jsem kriticky posoudil v recentně publikované studii [48]. Byla prezentována hypotéza, že aplikace CBD může zasáhnout do vzájemné komunikace (interplay) mezi G<sup>+</sup>/G<sup>-</sup>-bakteriemi a buňkami parodontu, což by mohlo vést k protizánětlivému či cytoprotektivnímu účinku. Na druhou stranu, při interpretaci studií popisujících protizánětlivé působení CBD, je nutné vzít v úvahu proti-argumentaci založenou na imunosupresivním působení CBD. CBD by tak mohlo oslabit imunitní systém parodontu a zabránit tak eliminaci periopatogenů. Nalezení odpovědi na výše uvedenou argumentaci, bylo hlavní motivací pro realizaci preklinických experimentů a klinické studie popsané v této disertační práci. Na úrovni preklinických dat jsme prokázali antimikrobiální účinek CBD na vybrané kmeny orálních patogenních bakterií. Následně byl v rámci klinické intervenční studie prokázán protizánětlivý účinek CBD a jeho schopnost inhibovat růst periopatogenů. Mezi zásadní výsledek studie patří statisticky významné zlepšení GI, GBI a MGI po 56denní aplikaci CBD u pacientů s jednoznačně diagnostikovanou parodontitis chronica. Získané výsledky by mohly posloužit jako základ pro komplexnější studie zaměřené na aplikaci nepsychotropních kanabinoidů v zubním lékařství.

## 6. Seznam zkratek

2-AG - 2-arachidonoylglycerol

BHI - mozko-srdcová infuze

CB1 - kanabinoidní receptor, podtyp 1

CB2 - kanabinoidní receptor, podtyp 2

CBC - kanabichromen

CBD - kanabidiol

CBG - kanabigerol

CBGA - kanabigerolové kyselina

CBN - kanabinol

CBVN - kanabivarin

CONSORT - consolidated standards of reporting trial

COX-2 - cyclooxygenasa-2

CYP - cytochrom P450

DMSO - dimethylsulfoxid

EKS - endokanabinoidní systém

EPS - extracelulární polysacharidová hmota

FHPL - fibroblasty humánních periodontálních ligament

GBI - gingival bleeding index (index krvácivosti gingivy)

GI - gingival index (gingivální index)

HGFs - lidské gingivální fibroblasty

IFN $\gamma$  - interferon-gamma

IL - interleukin

LPS - lipopolysacharid

MGI - modified gingival index (modifikovaný gingivální index)

MIC - minimální inhibiční koncentrace

MMP-2 - matrixová metaloproteinasa-2

MV - membránové váčky

NF $\kappa$ B - nuclear factor  $\kappa$ B

Nrf2 - nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2

PB - polymyxin B

PCR - polymerázová řetězová reakce

PEA - palmitoyletanolamid

PGE2 - prostaglandin E2

PI - plaque index (plakový index)

PPAR - peroxisome proliferator-activated receptor

rDNA - ribozomální, deoxyribonukleová kyselina

RMSSE - root-mean-square standardized effect

SD - směrodatná odchylka

TGF- $\beta$  - transforming growth factor  $\beta$

TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor-alpha

USD - americký dolar

WCHA - Wilkins-Chalgren agar

## **7. Seznam obrázků**

**Obr. 1:** Indikační kritéria pro preskripci léčebného konopí v ČR.

**Obr. 2:** Chemická struktura kanabidiolu.

**Obr. 3:** Produkce konopné pryskyřice.

**Obr. 4:** Stádia parodontálního onemocnění.

**Obr. 5:** Staging parodontitis.

**Obr. 6:** Ortopantomogram, Stage I parodontitis.

**Obr. 7:** Ortopantomogram, Stage II parodontitis.

**Obr. 8:** Ortopantomogram, Stage III parodontitis.

**Obr. 9:** Ortopantomogram, Stage IV parodontitis.

**Obr. 10:** Grading parodontitis.

**Obr. 11:** MIC *P. gingivalis*.

**Obr. 12:** MIC *S. mutans*.

**Obr. 13:** CONSORT schéma.

**Obr. 14:** Sterilní papírové čepy s transportní nádobou.

**Obr. 15:** Výsledky amplifikace specifických 16S rDNA úseků periopatogenních bakterií pomocí PCR.

## **8. Seznam tabulek**

**Tab. 1:** Dělení fytkanabinoidů do chemických tříd.

**Tab. 2:** Prevalence parodontitis v USA u pacientů starších 30 let (2009-2014).

**Tab. 3:** Projevy a důsledky kouření marihuany na dutinu ústní.

**Tab. 4:** Účinné látky prostředků ústní hygieny.

**Tab. 5:** Účinek CBD na LPS indukovanou expresi prozánětlivých markerů u některých typů buněk.

**Tab. 6:** Charakteristika pacienta.

**Tab. 7:** Odhad velikosti vzorku.

**Tab. 8:** Rozsah naměřených hodnot MIC.

**Tab. 9.** Změny ve sledovaných indexech v průběhu studie: Russellův parodontální index (PI), plakový index (PLI), gingivální index (GI), index krvácivosti gingivy (GBI) a modifikovaný gingivální index (MGI).



## 9. Seznam grafů

**Graf 1:** Počet publikací s heslem CBD v databázi PubMed.

**Graf 2:** Hodnocení klinických dat. Krabicové grafy.

**Graf 3:** Výsledky mikrobiologického vyšetření pro *Porphyromonas gingivalis*.

**Graf 4:** Výsledky mikrobiologického vyšetření pro (A) *Porphyromonas gingivalis* (B) *Tannerella forsythia*, (C) *Treponema denticola*, (D) *Parvimonas micra*, (E) *Prevotella intermedia* and (F) *Fusobacterium nucleatum*.

**Graf 5:** Výsledky mikrobiologického vyšetření pro (A) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, (B) *Campylobacter rectus*, (C) *Eubacterium nodatum*, (D) *Eikenella corrodens*, (E) *Capnocytophaga* sp.

## 10. Seznam odborných publikací autora

### Seznam článků publikovaných v odborných časopisech s IF:

**Jirasek P**, Jusku A, Simanek V, Frankova J, Storch J, Vacek J. Cannabidiol and periodontal inflammatory disease: A critical assessment. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2022 May;166(2):155-160. doi: 10.5507/bp.2022.012. Epub 2022 Mar 21. PMID: 35332345. **Impact Factor (2021) 1,648 \***

**Jirasek, P.**, Jusku, A., Frankova, J., Kolečkova, M., Diabelko, D., Ruzicka, F., Papouskova, B., Chytilova, K., Vrba, J., Havlasek, J., Langova, K., Storch, J., Voborna, I., Simanek, V. & Vacek, J. Phytocannabinoids and Gingival Inflammation: Pre-clinical Findings and a Placebo-controlled Double-blind Randomized Clinical Trial with Cannabidiol \*

- Článek odeslán (J. Periodontol.), přiloženo ve formě manuskriptu.

Jusku, A., Tomáščík, J., Václavek, L., **Jirásek, P.**, Harvan, L., Holík, P., & Čtvrtlík, R. (2021). Physical Properties of Modern Reciprocal Endodontic Systems and Fatigue Failure Testing in Simulated Clinical Conditions. Applied Sciences, 11(23), 11160. **Impact Factor (2020) 2,679**

### Seznam článků publikovaných v odborných časopisech bez IF:

**Jirásek, P.**, Diabelko, D., Růžička F., Voborná I., Štorch J., Vacek J. Účinky nepsychotropních fytokannabinoidů na orální bakterie – in vitro studie. \*

- In Print - přijato do tisku do časopisu Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství

Jusku, A., Dodeková, T., Staněk, J., Özel, B., **Jirásek, P.**, Polanská, V., & Harvan, L. (2022). Únavová fraktura nikl-titanových nástrojů v endodoncii a faktory ji ovlivňující. Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství, 122(2), 51-58. <https://doi.org/10.51479/cspzl.2022.005>

Jusku, A., **Jirásek, P.**, Petřivalská, A., Rosa, M., Staněk, J., & Harvan, L. (2020). Unicone plus vs. unicone - in vitro studie cyklické únavy při různých teplotách okolního prostředí. Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství, 120(3), 88-93. <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-stomatologie/2020-3-17/unicone-plus-vs-unicone-in-vitro-studie-cyklicke-unavy-pri-ruznych-teplotach-okolniho-prostredi-124059>

\* **Publikace s přímým vztahem k tématu disertačního spisu.**

**Grantový projekt**

IGA\_LF\_2020\_038

**Pilotní zkouška hodnotící vliv kanabinoidů na parodontitis chronica**

Hlavní řešitel, počátek řešení 03/2020

**Publikovaná abstrakta:**

**Jirásek P.:** „Okluzní registráty a jejich využití v protetickém zubním lékařství“ v Olomouci dne 30.10.2020 (Sborník abstrakt konference „Úsměv 020“)

**Jirásek P.:** „Artikulátory a jejich správné nastavení v rámci protetické léčby“ v Olomouci dne 19.9.2020 (Sborník abstrakt konference „Dens Sanus Olomucensis 2020“)

**Jirásek P.:** „Přehled tvorby biofilmu na různých typech protetických materiálů“ v Olomouci dne 5.4.2019 (Sborník abstrakt konference „Úsměv 019“ byl publikován v časopisu Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství 2/2019)

**Jirásek P.:** „Estetická rekonstrukce horního frontálního úseku“ v Olomouci dne 6.4.2018 (Sborník abstrakt konference „Úsměv 018“)

## 11. Literatura

1. National Institutes of Health. Oral health in America: advances and challenges. US Department of Health and Human Services, National Institute of Dental and Craniofacial Research: Bethesda, MD, USA. 2021.
2. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1614-48.
3. Linnaeus Cv. *Species plantarum*, vol. 1. Holmiae [Stockholm]: impensis Laurentii Salvii. 1753.
4. Jiang HE, Li X, Zhao YX, Ferguson DK, Hueber F, Bera S, et al. A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J Ethnopharmacol*. 2006;108(3):414-22.
5. Abel EL. Cannabis in the Ancient World. In: Abel EL, editor. *Marihuana: The First Twelve Thousand Years*. Boston, MA: Springer US; 1980. p. 3-35.
6. Thompson RC. A dictionary of Assyrian botany. British A, editor. London: British Academy; 1949.
7. Hanus LO. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev*. 2009;29(2):213-71.
8. Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, del Bianco F, et al. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J Exp Bot*. 2008;59(15):4171-82.
9. Becker CE. Licit and Illicit Drugs: The Consumers Union Report on Narcotics, Stimulants, Depressants, Inhalants, Hallucinogens, and Marijuana—Including Caffeine, Nicotine and Alcohol. *Western Journal of Medicine*. 1974;120(2):180.
10. Moreau JJ. *Hashish and mental illness*: Raven Press; 1973.
11. Green J. *Cannabis*. New York: Thunder's Mouth Press; 2002.
12. Aldrich M. Therapeutic Cannabis. Cannabis in medical practice: A legal, historical and pharmacological overview of the therapeutic use of marijuana. 1997:35.
13. Evans FJ. The medicinal chemistry of cannabis: O'Shaughnessy's legacy. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 1997;3(11):533-7.
14. Musto DF. The Marihuana Tax Act of 1937. *Arch Gen Psychiatry*. 1972;26(2):101-8.
15. Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, et al. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol*. 2018;227:300-15.
16. Krejčí Z. Antibiotický princip Cannabis indica. The antibiotic effect of Cannabis indica Brno, Czechoslovakia: Masaryk University. 1950:106.
17. Krejčí Z. The antibacterial effect of Cannabis indica. *Lék listy*. 1952;7:500.
18. Kabelik J, Krejci Z, Santavy F. Cannabis as a medicament. *Bull Narc*. 1960;12(3):5-23.
19. Hanuš LO, Hod Y. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Med Cannabis Cannabinoids*. 2020;3(1):25-60.
20. Wood TB, Spivey WTN, Easterfield TH. III.—Cannabinol. Part I. *J Chem Soc*. 1899;75(0):20-36.
21. Jacob A, Todd AR. 119. Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *J Chem Soc*. 1940(0):649-53.
22. Adams R, Baker BR, Wearn RB. Structure of Cannabinol. III. Synthesis of Cannabinol, 1-Hydroxy-3-n-amylo-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran-1. *J Am Chem Soc*. 1940;62(8):2204-7.
23. Krejčí Z, Šantavý F. Isolace dalších látek z listí indického konopí Cannabis sativa L (Isolation of other substances from the leaves of the Indian hemp (Cannabis sativa L, varietas indica) *Acta Univ Palacki Olomuc*. 1955;6:59-66.
24. Hanuš L, Krejčí Z, Hruban L. Isolation of cannabidiolic acid from Turkish variety of cannabis cultivated for fibre. *Acta Univ Olomuc Fac Med*. 1975;74:167-72.

25. Krejčí Z, Horák M, Šantavý F. Konstituce kyseliny kanabidiolové a kyseliny bt 133° C izolovaných z *Cannabis sativa* L. (Constitution of the cannabidiolic acid and of an acid of the MP 133, isolated from *Cannabis sativa* L. Acta Univ Palacki Olomuc. 1958;16:9-17.
26. Mechoulam R, Shvo Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. Tetrahedron. 1963;19(12):2073-8.
27. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. J Am Chem Soc. 1964;86(8):1646-7.
28. Šantavý F. Notes on the structure of cannabidiol compounds. Acta Univ Palacki Olomuc. 1964;35:5-9.
29. Izquierdo I, Orsingher OA, Berardi AC. Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. Psychopharmacologia. 1973;28(1):95-102.
30. Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, et al. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacology. 1980;21(3):175-85.
31. Devinsky O, Cross JH, Laux L, Marsh E, Miller I, Nabbout R, et al. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. N Engl J Med. 2017;376(21):2011-20.
32. Thiele EA, Marsh ED, French JA, Mazurkiewicz-Beldzinska M, Benbadis SR, Joshi C, et al. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet. 2018;391(10125):1085-96.
33. SÚKL. 2022 [citováno 2022 18.11.2022]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/konopi-pro-lecebne-pouziti>.
34. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. Eur J Pharmacol. 1998;353(1):23-31.
35. Russo EB. The Case for the Entourage Effect and Conventional Breeding of Clinical Cannabis: No "Strain," No Gain. Front Plant Sci. 2018;9:1969.
36. Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Zulfikar F, Matsumoto RR, et al. Cannabinoid ester constituents from high-potency *Cannabis sativa*. J Nat Prod. 2008;71(4):536-42.
37. ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. Prog Chem Org Nat Prod. 2017;103:1-36.
38. Jastrząb A, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. The Origin and Biomedical Relevance of Cannabigerol. Int J Mol Sci. 2022;23(14).
39. Giacoppo S, Gugliandolo A, Trubiani O, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, et al. Cannabinoid CB2 receptors are involved in the protection of RAW264. 7 macrophages against the oxidative stress: an in vitro study. Eur J Histochem. 2017;61(1).
40. Gugliandolo A, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzon E. In vitro model of neuroinflammation: Efficacy of cannabigerol, a non-psychoactive cannabinoid. Int J Mol Sci. 2018;19(7):1992.
41. Rosenthaler S, Pöhn B, Kolmanz C, Huu CN, Krewenka C, Huber A, et al. Differences in receptor binding affinity of several phytocannabinoids do not explain their effects on neural cell cultures. Neurotoxicol Teratol. 2014;46:49-56.
42. Udoh M, Santiago M, Devenish S, McGregor IS, Connor M. Cannabichromene is a cannabinoid CB2 receptor agonist. Br J Pharmacol. 2019;176(23):4537-47.
43. Peters EN, MacNair L, Mosesova I, Christians U, Sempio C, Klawitter J, et al. Pharmacokinetics of cannabichromene in a medical cannabis product also containing

- cannabidiol and  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol: a pilot study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2022;78(2):259-65.
44. Jones PG, Falvello L, Kennard O, Sheldrick GM, Mechoulam R. Cannabidiol. *Acta Crystallogr B*. 1977;33(10):3211-4.
  45. Russo EB. Cannabidiol Claims and Misconceptions. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(3):198-201.
  46. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86(8):1646-7.
  47. Santavy F. Notes on the structure of cannabidiol compounds. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*. 1964;35:5-9.
  48. Jirasek P, Jusku A, Simanek V, Frankova J, Storch J, Vacek J. Cannabidiol and periodontal inflammatory disease: A critical assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2022;166(2):155-60.
  49. Lowe H, Toyang N, Steele B, Bryant J, Ngwa W, Nedamat K. The Current and Potential Application of Medicinal Cannabis Products in Dentistry. *Dent J (Basel)*. 2021;9(9).
  50. David C, Elizalde-Hernández A, Barboza AS, Cardoso GC, Santos MBF, Moraes RR. Cannabidiol in Dentistry: A Scoping Review. *Dent J (Basel)*. 2022;10(10).
  51. Bonn-Miller MO, Loflin MJE, Thomas BF, Marcu JP, Hyke T, Vandrey R. Labeling Accuracy of Cannabidiol Extracts Sold Online. *Jama*. 2017;318(17):1708-9.
  52. Millar SA, Maguire RF, Yates AS, O'Sullivan SE. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(9).
  53. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):327-60.
  54. Spindle TR, Bonn-Miller MO, Vandrey R. Changing landscape of cannabis: novel products, formulations, and methods of administration. *Curr Opin Psychol*. 2019;30:98-102.
  55. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Ghosh P, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther Deliv*. 2010;1(1):109-31.
  56. Samara E, Bialer M, Mechoulam R. Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs. *Drug Metab Dispos*. 1988;16(3):469-72.
  57. Crockett J, Critchley D, Tayo B, Berwaerts J, Morrison G. A phase 1, randomized, pharmacokinetic trial of the effect of different meal compositions, whole milk, and alcohol on cannabidiol exposure and safety in healthy subjects. *Epilepsia*. 2020;61(2):267-77.
  58. Brown JD, Winterstein AG. Potential Adverse Drug Events and Drug-Drug Interactions with Medical and Consumer Cannabidiol (CBD) Use. *J Clin Med*. 2019;8(7):989.
  59. Merrick J, Lane B, Sebree T, Yaksh T, O'Neill C, Banks SL. Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in Simulated Gastric and Physiological Fluid. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016;1(1):102-12.
  60. Grotenhermen F, Russo E, Zuardi AW. Even high doses of oral cannabidiol do not cause THC-like effects in humans: Comment on Merrick et al. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2016; 1 (1): 102–112; DOI: 10.1089/can. 2015.0004. *Cannabis and Cannabinoid Res*. 2017;2(1):1-4.
  61. Consroe P, Kennedy K, Schram K. Assay of plasma cannabidiol by capillary gas chromatography/ion trap mass spectroscopy following high-dose repeated daily oral administration in humans. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991;40(3):517-22.
  62. Martin-Santos R, Crippa JA, Batalla A, Bhattacharyya S, Atakan Z, Borgwardt S, et al. Acute effects of a single, oral dose of  $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers. *Curr Pharm Des*. 2012;18(32):4966-79.
  63. Di Marzo V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res*. 2009;60(2):77-84.

64. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34(5):605-13.
65. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
66. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90.
67. Silver RJ. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals (Basel)*. 2019;9(9):686.
68. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
69. Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(11):757-64.
70. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(10):515-27.
71. Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol*. 2019;12(3):239-48.
72. Navarro G, Gonzalez A, Sánchez-Morales A, Casajuana-Martin N, Gómez-Ventura M, Cordoní A, et al. Design of Negative and Positive Allosteric Modulators of the Cannabinoid CB(2) Receptor Derived from the Natural Product Cannabidiol. *J Med Chem*. 2021;64(13):9354-64.
73. Konermann A, Jäger A, Held SAE, Brossart P, Schmöle A. *In vivo* and *In vitro* Identification of Endocannabinoid Signaling in Periodontal Tissues and Their Potential Role in Local Pathophysiology. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(8):1511-20.
74. Jäger A, Setiawan M, Beins E, Schmidt-Wolf I, Konermann A. Analogous modulation of inflammatory responses by the endocannabinoid system in periodontal ligament cells and microglia. *Head Face Med*. 2020;16(1):26.
75. Abidi AH, Abhyankar V, Alghamdi SS, Tipton DA, Dabbous M. Phytocannabinoids regulate inflammation in IL-1 $\beta$ -stimulated human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2022.
76. O'Sullivan SE. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol*. 2016;173(12):1899-910.
77. Taskan MM, Gevrek F. PPAR- $\gamma$ , RXR, VDR, and COX-2 Expressions in gingival tissue samples of healthy individuals, periodontitis and peri-implantitis patients. *Niger J Clin Pract*. 2020;23(1):46-53.
78. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023.
79. Chiu AV, Saigh MA, McCulloch CA, Glogauer M. The Role of Nrf2 in the Regulation of Periodontal Health and Disease. *J Dent Res*. 2017;96(9):975-83.
80. Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel)*. 2019;9(1).
81. Vacek J, Vostalova J, Papouskova B, Skarupova D, Kos M, Kabelac M, et al. Antioxidant function of phytocannabinoids: Molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation. *Free Radic Biol Med*. 2021;164:258-70.
82. Parker LA, Rock EM, Mechoulam R. CBD: What Does the Science Say?: The MIT Press; 2022.
83. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(14):8268-73.

84. Singer E, Judkins J, Salomonis N, Matlaf L, Soteropoulos P, McAllister S, et al. Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 2015;6(1):e1601.
85. Cuba LF, Salum FG, Cherubini K, Figueiredo MAZ. Cannabidiol: an alternative therapeutic agent for oral mucositis? *J Clin Pharm Ther.* 2017;42(3):245-50.
86. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr.* 2015;3(2):Mb-0001-2014.
87. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:883-93.
88. Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod.* 2008;71(8):1427-30.
89. Martinenghi LD, Jønsson R, Lund T, Jenssen H. Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules.* 2020;10(6).
90. Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliott AG, Zhang B, Ramu S, Amado M, et al. The antimicrobial potential of cannabidiol. *Commun Biol.* 2021;4(1):7.
91. Abichabki N, Zacharias LV, Moreira NC, Bellissimo-Rodrigues F, Moreira FL, Benzi JRL, et al. Potential cannabidiol (CBD) repurposing as antibacterial and promising therapy of CBD plus polymyxin B (PB) against PB-resistant gram-negative bacilli. *Sci Rep.* 2022;12(1):6454.
92. Kosgodage US, Matewele P, Awamaria B, Kraev I, Warde P, Mastroianni G, et al. Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(324).
93. Gu Z, Singh S, Niyogi RG, Lamont GJ, Wang H, Lamont RJ, et al. Marijuana-Derived Cannabinoids Trigger a CB2/PI3K Axis of Suppression of the Innate Response to Oral Pathogens. *Front Immunol.* 2019;10.
94. Righolt AJ, Jevdjevic M, Marcenes W, Listl S. Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *J Dent Res.* 2018;97(5):501-7.
95. Hartman M, Martin AB, Benson J, Catlin A. National Health Care Spending In 2018: Growth Driven By Accelerations In Medicare And Private Insurance Spending. *Health Aff (Millwood).* 2020;39(1):8-17.
96. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013;92(7):592-7.
97. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S1-s8.
98. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Sci World J.* 2020;2020:2146160.
99. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014;93(7 Suppl):20s-8s.
100. Ramsay SE, Whincup PH, Watt RG, Tsakos G, Papacosta AO, Lennon LT, et al. Burden of poor oral health in older age: findings from a population-based study of older British men. *BMJ Open.* 2015;5(12):e009476.
101. Eke PI, Thornton-Evans GO, Wei L, Borgnakke WS, Dye BA, Genco RJ. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *J Am Dent Assoc.* 2018;149(7):576-88.e6.



102. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(6):E791-800.
103. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):122-8.
104. Jia G, Zhi A, Lai PFH, Wang G, Xia Y, Xiong Z, et al. The oral microbiota - a mechanistic role for systemic diseases. *Br Dent J*. 2018;224(6):447-55.
105. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;11(2):72-80.
106. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
107. Slots J. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):7-23.
108. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:57-71.
109. Belák Š, Starosta M, Žižka R, Šedý J. Nová klasifikace parodontálních a periimplantátových onemocnění. LKS (Praha). 2019;29(1):10-7.
110. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S159-s72.
111. Bergstrom J. Smoking rate and periodontal disease prevalence: 40-year trends in Sweden 1970-2010. *J Clin Periodontol*. 2014;41(10):952-7.
112. Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004;75(2):196-209.
113. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(11):1247-53.
114. Söder B, Jin LJ, Wickholm S. Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E 2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2002;29(5):384-91.
115. Matthews JB, Chen FM, Milward MR, Ling MR, Chapple ILC. Neutrophil superoxide production in the presence of cigarette smoke extract, nicotine and cotinine. *J Clin Periodontol*. 2012;39(7):626-34.
116. Thomson WM, Poulton R, Broadbent JM, Moffitt TE, Caspi A, Beck JD, et al. Cannabis smoking and periodontal disease among young adults. *JAMA*. 2008;299(5):525-31.
117. Shariff JA, Ahluwalia KP, Papapanou PN. Relationship Between Frequent Recreational Cannabis (Marijuana and Hashish) Use and Periodontitis in Adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2011 to 2012. *J Periodontol*. 2017;88(3):273-80.
118. Ditmyer M, Demopoulos C, McClain M, Dounis G, Mobley C. The effect of tobacco and marijuana use on dental health status in Nevada adolescents: a trend analysis. *J Adolesc Health*. 2013;52(5):641-8.
119. Kowitt SD, Osman A, Ranney LM, Heck C, Goldstein AO. E-Cigarette Use Among Adolescents Not Susceptible to Using Cigarettes. *Prev Chronic Dis*. 2018;15:E18.
120. Chisini LA, Cademartori MG, Francia A, Mederos M, Grazioli G, Conde MC, et al. Is the use of Cannabis associated with periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *J Periodont Res*. 2019;54(4):311-7.
121. Meier MH. Associations between butane hash oil use and cannabis-related problems. *Drug Alcohol Depend*. 2017;179:25-31.
122. Darling M, Arendorf T. Effects of cannabis smoking on oral soft tissues. *Community Dentist Oral Epidemiol*. 1993;21(2):78-81.

123. Darling M, Arendorf T, Coldrey N. Effect of cannabis use on oral candidal carriage. *J Oral Pathol Med.* 1990;19(7):319-21.
124. Schulz-Katterbach M, Imfeld T, Imfeld C. Cannabis and caries-does regular cannabis use increase the risk of caries in cigarette smokers. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin SMfZ.* 2009;119(6):576-83.
125. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell.* 2018;9(5):488-500.
126. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019;5(1):eaau3333.
127. Vencovský J, Šedová L, Růžicková Š. Protilátky proti citrulinovaným proteinům u revmatoidní artritidy. *Čes revmatol.* 2005;13(4):164-75.
128. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(10):606-20.
129. Grau AJ, Becher H, Ziegler CM, Lichy C, Buggle F, Kaiser C, et al. Periodontal disease as a risk factor for ischemic stroke. *Stroke.* 2004;35(2):496-501.
130. Dörtbudak O, Eberhardt R, Ulm M, Persson GR. Periodontitis, a marker of risk in pregnancy for preterm birth. *J Clin Periodontol.* 2005;32(1):45-52.
131. Radochova V, Stepan M, Musilova IK, Slezak R, Vescicik P, Menon R, et al. Association between periodontal disease and preterm prelabour rupture of membranes. *J Clin Periodontol.* 2019;46(2):189-96.
132. Guardado-Luevanos I, Bologna-Molina R, Zepeda-Nuño JS, Isiordia-Espinoza M, Molina-Frechero N, González-González R, et al. Self-Reported Periodontal Disease and Its Association with SARS-CoV-2 Infection. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(16).
133. Sukumar K, Tadepalli A. Nexus between COVID-19 and periodontal disease. *J Int Med Res.* 2021;49(3):03000605211002695.
134. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
135. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.
136. Xiao J, Koo H. Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. *J Appl Microbiol.* 2010;108(6):2103-13.
137. McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol.* 2011;10(1):39-50.
138. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):155-66.
139. Walterova D, Ulrichova J, Valka I, Vicar J, Vavreckova C, Taborska E, et al. Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: biological activities and dental care applications. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 1995;139:7-16.
140. Huang RY, Lu SH, Su KW, Chen JK, Fang WH, Liao WN, et al. Diacerein: a potential therapeutic drug for periodontal disease. *Med Hypotheses.* 2012;79(2):165-7.
141. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):588-631.
142. Balagopal S, Arjunkumar R. Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *J Pharm Sci Res.* 2013;5:270-4.

143. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: An Adjunct to Periodontal Therapy. *J Periodontol.* 1986;57(6):370-7.
144. da Costa LFP, Amaral CdSF, Barbirato DdS, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(5):308-18.
145. Hussain U, Alam S, Rehman K, Antonoglou GN, Papageorgiou SN. Effects of chlorhexidine use on periodontal health during fixed appliance orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod.* 2022.
146. Shaddox LM, Walker CB. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2010;2:79-91.
147. Checchi L, Pelliccioni GA. Hand versus ultrasonic instrumentation in the removal of endotoxins from root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1988;59(6):398-402.
148. Dragoo MR. A Clinical Evaluation of Hand and Ultrasonic Instruments on Subgingival Debridement. Part I. With Unmodified and Modified Ultrasonic Inserts. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1992;12(4).
149. Hirschfeld L, Wasserman B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol.* 1978;49(5):225-37.
150. LARSEN T, FIEHN N-E. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS.* 1996;104(1-6):280-4.
151. Shaddox LM, Walker C. Microbial testing in periodontics: value, limitations and future directions. *Periodontol 2000.* 2009;50(1):25-38.
152. Rooney J, Wade W, Sprague S, Newcombe R, Addy M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined: A placebo controlled study. *J Clin Periodontol.* 2002;29(4):342-50.
153. Winkel E, Van Winkelhoff A, Van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 1998;25(11):857-64.
154. Rawal SY, Dabbous MK, Tipton DA. Effect of cannabidiol on human gingival fibroblast extracellular matrix metabolism: MMP production and activity, and production of fibronectin and transforming growth factor  $\beta$ . *J Periodont Res.* 2012;47(3):320-9.
155. Hobbs JM, Vazquez AR, Remijan ND, Trotter RE, McMillan TV, Freedman KE, et al. Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytother Res.* 2020;34(7):1696-703.
156. Muthumalage T, Rahman I. Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;382:114713.
157. Rajan TS, Giacoppo S, Iori R, De Nicola GR, Grassi G, Pollastro F, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a combination of cannabidiol and moringin in LPS-stimulated macrophages. *Fitoterapia.* 2016;112:104-15.
158. Ruhl T, Kim BS, Beier JP. Cannabidiol restores differentiation capacity of LPS exposed adipose tissue mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res.* 2018;370(2):653-62.
159. Sermet S, Li J, Bach A, Crawford RB, Kaminski NE. Cannabidiol selectively modulates interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 production in toll-like receptor activated human peripheral blood monocytes. *Toxicology.* 2021;464:153016.
160. Silva RL, Silveira GT, Wanderlei CW, Cecilio NT, Maganin AGM, Franchin M, et al. DMH-CBD, a cannabidiol analog with reduced cytotoxicity, inhibits TNF production by targeting NF- $\kappa$ B activity dependent on A2A receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;368:63-71.
161. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012;15:117-32.

162. Napimoga MH, Benatti BB, Lima FO, Alves PM, Campos AC, Pena-dos-Santos DR, et al. Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(2):216-22.
163. Libro R, Scionti D, Diomede F, Marchisio M, Grassi G, Pollastro F, et al. Cannabidiol Modulates the Immunophenotype and Inhibits the Activation of the Inflammasome in Human Gingival Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol.* 2016;7:559.
164. Klein M, Salum FG, Cherubini K, de Figueiredo MAZ. Cannabidiol as a novel therapeutic strategy for oral inflammatory diseases: A review of current knowledge and future perspectives. *Altern Ther Health Med.* 2020;26:12-6.
165. Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):833.
166. Kozono S, Matsuyama T, Biwasa KK, Kawahara Ki, Nakajima Y, Yoshimoto T, et al. Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394(4):928-33.
167. Stahl V, Vasudevan K. Comparison of Efficacy of Cannabinoids versus Commercial Oral Care Products in Reducing Bacterial Content from Dental Plaque: A Preliminary Observation. *Cureus.* 2020;12(1):e6809-e.
168. Vasudevan K, Stahl V. Cannabinoids infused mouthwash products are as effective as chlorhexidine on inhibition of total-culturable bacterial content in dental plaque samples. *J Cannabis Res.* 2020;2(1):20.
169. Modabber M, Campbell KM, McMurtry CM, Taddio A, Dempster LJ. Children's Perceptions of Dental Experiences and Ways to Improve Them. *Children.* 2022;9(11):1657.
170. Crippa JA, Zuardi AW, Martín-Santos R, Bhattacharyya S, Atakan Z, McGuire P, et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol.* 2009;24(7):515-23.
171. Crippa JAS, Zuardi AW, Guimarães FS, Campos AC, de Lima Osório F, Loureiro SR, et al. Efficacy and Safety of Cannabidiol Plus Standard Care vs Standard Care Alone for the Treatment of Emotional Exhaustion and Burnout Among Frontline Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open.* 2021;4(8):e2120603.
172. Wheeler M, Merten JW, Gordon BT, Hamadi H. CBD (Cannabidiol) Product Attitudes, Knowledge, and Use Among Young Adults. *Subst Use Misuse.* 2020;55(7):1138-45.
173. (CLSI) CaLSI. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria.* 9th ed. CLSI standard M11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA. 2018
174. Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ (Clin Res Ed).* 2010;340:c32.
175. Emanuel EJ. Reconsidering the declaration of Helsinki. *Lancet.* 2013;381:1532-3.
176. Russell AL. A System of Classification and Scoring for Prevalence Surveys of Periodontal Disease. *J Dent Res.* 1956;35(3):350-9.
177. Löe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol.* 1967;38(6):Suppl:610-6.
178. Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963;21(6):533-51.
179. Silness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand.* 1964;22(1):121-35.
180. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229-35.

181. Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clini Prevent Dent*. 1986;8(1):3-6.
182. Jusku A, Tomáščík J, Václavek L, Jirásek P, Harvan Ľ, Holík P, et al. Physical Properties of Modern Reciprocal Endodontic Systems and Fatigue Failure Testing in Simulated Clinical Conditions. *Appl Sci-Basel*. 2021;11(23):11160.
183. Karas JA, Wong LJM, Paulin OKA, Mazeh AC, Hussein MH, Li J, et al. The antimicrobial activity of cannabinoids. *Antibiotics*. 2020;9(7):1-10.
184. Gu Z, Singh S, Niyogi RG, Lamont GJ, Wang H, Lamont RJ, et al. Marijuana-Derived Cannabinoids Trigger a CB2/PI3K Axis of Suppression of the Innate Response to Oral Pathogens. *Front Immunol*. 2019;10:2288.
185. Haffajee AD, Yaskell T, Socransky SS. Antimicrobial effectiveness of an herbal mouthrinse compared with an essential oil and a chlorhexidine mouthrinse. *J Am Dental Assoc*. 2008;139(5):606-11.
186. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: From "who are they?" to "what are they doing?". *J Dent Res*. 2015;94(12):1628-37.