



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Reactivity of neutrophils, monocytes and platelets in periodontitis

Nicu, E.A.

Publication date
2008

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Nicu, E. A. (2008). *Reactivity of neutrophils, monocytes and platelets in periodontitis*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Samenvatting

Parodontitis is een chronische infectieuze aandoening van de tand ondersteunende weefsels (het parodontium), die uiteindelijk leidt tot het verlies van tanden wanneer er niet behandeld wordt. De reactie van de gastheer op bacteriële accumulatie op de gebitselementen leidt tot chronische ontsteking van het parodontium. De kenmerken van parodontale ontsteking zijn bloeding van de gingiva, vorming van diepe parodontale pockets en progressieve afbraak van het parodontaal ligament en het alveolaire bot. Hoewel bacteriën essentieel zijn voor het ontstaan en de progressie van parodontitis, blijken ook genetische en lifestyle factoren een grote invloed te hebben op de vatbaarheid voor en de ernst van de ziekte, alsmede de reactie op behandeling. Deze nieuwe inzichten moeten nog geïmplementeerd worden bij geïndividualiseerde patiëntenzorg. Identificatie van individuen met verhoogde vatbaarheid voor parodontitis zou een belangrijke stap voorwaarts zijn. Zij zouden uiteindelijk intensievere preventie en behandelingsstrategieën nodig hebben.

Het analyseren van de gastheerreactie op de parodontale bacteriële pathogenen is één van de mogelijke benaderingen in de richting van het identificeren van modificerende factoren voor de vatbaarheid voor parodontitis. In dit proefschrift hebben we het belang van de polymorphonucleaire leukocyten (PMNs) en monocytten (deze cel typen zijn beiden fagocyten), in de verdediging tegen parodontale pathogenen geanalyseerd, en in het bijzonder hebben we de functie onderzocht van de receptoren die verantwoordelijk zijn voor de herkenning van de bacteriën.

In **Hoofdstuk 2** hebben we FcγRIIa op PMNs geanalyseerd, met een focus op een single nucleotide polymorfisme in het FcγIIa gen (*FCG2A*). FcγIIa (één van de typen receptoren voor het Fc gedeelte van immunoglobulines, IgG) stuurt fagocytose en cel activering aan. Eerdere studies hebben aangetoond dat één van de genetische varianten van FcγIIa, FcγIIa^{131H/H}, in staat is om humaan IgG2 efficiënt te binden, terwijl de andere twee varianten, FcγIIa^{131H/R} of FcγIIa^{131R/R}, dat ook wel kunnen, maar met een verminderde affiniteit. IgG2 is de voornaamste IgG subklasse tegen parodontale pathogenen en opsonisatie met IgG, en in parodontitis vooral met IgG2, helpt bij een efficiënte herkenning van bacteriën door fagocyten. Wij hebben gehypothetiseerd dat dit polymorfisme in het *FCG2A* gen, de reactiviteit verandert van PMNs in respons op parodontale pathogenen. Onze resultaten laten zien dat PMNs van individuen met het FcγIIa^{131H/H} genotype meer bacteriën fagocyteren als reactie op de stimulatie met de parodontale paropathogeen *A. actinomycetemcomitans*. Tijdens dit fagocytose proces scheiden de granulen van FcγIIa^{131H/H} PMNs meer enzymen uit waaronder meer actief

elastase, dan FcγIIa^{131R/R} PMNs, hetgeen een hyperactief fenotype van de FcγIIa^{131H/H} PMNs suggereert. Voor het ziekteproces parodontitis betekent dit dat naast de reactieve zuurstof radicalen die geproduceerd worden tijdens de oxidatieve stress van de PMNs, ook de degranulatie producten (matrix metallo proteinases, elastase) van de PMNs verantwoordelijk zijn voor afbraak van bind- en steunweefsel bij parodontitis (1,2,3). Derhalve zou de hyper-activiteit van de FcγIIa^{131H/H} PMNs één van de mechanismen kunnen zijn waardoor juist deze patiënten een ernstiger parodontale afbraak hebben in vergelijking met de FcγIIa^{131H/R} en FcγIIa^{131R/R} genotypen. Onze resultaten geven dan ook een mechanistische verklaring voor eerdere observaties van een toegenomen ernst van parodontale afbraak bij patiënten met het FcγIIa^{131H/H} genotype (4,5).

De hyperreactiviteit van PMNs bij parodontitis zou, naast de genetisch gecodeerde sterkere of zwakkere affiniteit van hun receptoren, ook veroorzaakt kunnen worden door een afwijkende expressie van deze receptoren in vergelijking met parodontaal gezonde controles. In **Hoofdstuk 3** hebben we zowel de cellulaire expressie van IgG receptoren (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa en FcγRIIIb), complement receptor CR3 en de LPS co-receptor CD14 op PMNs en monocyten onderzocht, als ook de activatie van deze cellen in reactie op de twee parodontale pathogenen *A. actinomycetemcomitans* en *P. gingivalis*. Onze resultaten laten een vergelijkbare expressie zien van de onderzochte receptoren op PMNs van parodontale patiënten en van gezonde controles. Wij suggereren dat de chronische ontstekingsreactie die gepaard gaat met parodontitis blijkbaar geen effect heeft op de PMN receptor expressie tijdens hun vorming in het beenmerg en tijdens hun kortstondige circulatie in het bloed. De monocyten daarentegen, lieten een verlaagde expressie van membraan-gebonden CD14 (mCD14) zien, in samenhang met een toename van FcγRIII expressie. Deze CD14^{low}FcγRIII⁺ monocyten zijn in de literatuur beschreven als voorlopers van een dendritisch celtype; deze celpopulatie neemt toe tijdens ontstekingen zoals reumatoïde artritis (6,7), sepsis (8) of de Kawasaki ziekte (9). De dendritische cellen die gevormd worden door de CD14^{low}FcγRIII⁺ monocyten hebben een fagocyterende en oxiderende capaciteit, maar zijn niet in staat om T cellen efficiënt te stimuleren tot een definitieve actie om de ontsteking te elimineren (10). Met deze bevindingen kennen wij een rol toe aan de CD14^{low}FcγRIII⁺ monocyten, die mogelijk de chroniciteit van parodontale ontsteking bevorderen dan wel in stand houden.

Daarnaast vonden wij dat personen die geïnfecteerd zijn met *A. actinomycetemcomitans*, een significant lagere expressie van monocyttaire FcγRI en FcγRIIa hebben dan personen die met *P. gingivalis* geïnfecteerd zijn. Deze verlaagde

Fc γ R expressie door monocyten kan gerelateerd zijn aan een verhoogde gevoeligheid voor een *A. actinomycetemcomitans* infectie, of aan een aanpassing aan deze specifieke infectie. Parallel aan deze bevinding zagen we ook dat PMNs van *A. actinomycetemcomitans* geïnfecteerde personen inderdaad op een hyperactieve manier reageerden op een bacteriële stimulans, in het bijzonder wanneer zij werden gestimuleerd met *A. actinomycetemcomitans*. Samenvattend suggereren deze resultaten een hyperreactiviteit van de PMNs bij *A. actinomycetemcomitans* geïnfecteerde personen, welke het immuunsysteem probeert te compenseren door de verlaging van Fc γ Rs expressie op monocyten. Desondanks zouden de hyperactieve PMNs kunnen bijdragen aan de ernstige en relatief snelle parodontale afbraak die gerapporteerd is in early-onset parodontitis patiënten, die zeer frequent geïnfecteerd zijn met *A. actinomycetemcomitans* (11).

Ondanks deze bevindingen is het toch niet helemaal duidelijk waarom bij personen die geïnfecteerd zijn met *A. actinomycetemcomitans* de PMN's hyperactief zijn. Wij veronderstellen dat een bepaalde genetische achtergrond deze personen meer vatbaar maken voor *A. actinomycetemcomitans* infectie. Dit scenario is al beschreven bij personen met genetische variaties in de genen coderend voor mannose-bindend lectine, vitamine D receptor, mannose-geassocieerde serine protease 2 en toll-like receptoren; deze personen hadden een groter risico op infectie met *Mycobacterium tuberculosis*, meningococci of gram negatieve bacteriën (12,13,14,15,16). Aan de andere kant zou het de infectie met *A. actinomycetemcomitans* zelf kunnen zijn die verantwoordelijk is voor de fenotypische veranderingen van de PMNs. Dit dilemma zou verder onderzocht kunnen worden met interventie studies, welke *A. actinomycetemcomitans* elimineren uit de subgingivale microflora.

Naast de cellulaire expressie van receptoren op fagocyten, hebben we in **Hoofdstuk 4** de plasma spiegels van de oplosbare vorm van CD14 (sCD14) geanalyseerd bij parodontitis patiënten en gezonde controles. sCD14 kan ontstaan door afscheiding / afknippen van membraan-gebonden CD14 op monocyten / macrofagen of sCD14 kan geproduceerd worden in de lever. Fungerend als een oplosbare LPS receptor, helpt sCD14 bij de activatie van cellen die van nature geen CD14 hebben, zoals endotheelcellen, epitheelcellen en gladde spiercellen. Een andere rol is de neutralisatie van LPS tijdens gram-negatieve infectieuze ziekteprocessen. Als neutraliserende factor voor serum LPS, verhindert sCD14 extreme proinflammatoire reacties van monocyten / macrofagen (18). Ook parodontitis is een ziekteproces waarbij gram-negatieve pathogenen de infectie vormen. Deze pathogenen komen in de bloedcirculatie terecht en zijn verantwoordelijk

voor endotoxemia bij parodontitis patiënten (19). Onze resultaten laten een toename in sCD14 plasma waardes zien, welke positief correleren met de ernst van de parodontale afbraak. Deze associatie suggereert dat het sCD14 toeneemt samen met de noodzaak om LPS uit de circulatie te verwijderen. Gezien de resultaten uit **Hoofdstuk 3**, waar we een verminderde membraan-gebonden CD14 expressie op monocytten van parodontitis patiënten hebben laten zien, zou de toename van het sCD14 gedeeltelijk toegeschreven kunnen worden aan de afscheiding van het membraan gebonden CD14 van monocytten. We hebben echter ook aangetoond dat de toename in sCD14 een positieve correlatie laat zien met de systemische ontstekingsmarker C-reactief proteïne (CRP) en met het aantal leukocyten in de circulatie. Dus we veronderstellen dat naast CRP, ook een verhoogde sCD14 productie in de lever bij de parodontitis patiënt plaatsvindt.

Het is aangetoond dat verschillende ontstekingsmarkers toekomstige vasculaire aandoeningen voorspellen (21,22,23). CRP en het aantal leukocyten, zijn o.a. aangewezen als markers voor hart- en vaatziekten (HVZ) (24,25). Verhoogde waardes van CRP en leukocyten in patiënten met HVZ worden tegenwoordig ook gezien als een mogelijk gevolg van chronisch infectieuze processen en ontstekingsreacties (26,27,28). Parodontitis is één van de chronische infectieuze aandoeningen die geassocieerd is met HVZ in verschillende epidemiologische studies (29). Daarnaast zijn verhoogde bloedwaarden van CRP en leukocyten gevonden bij patiënten met parodontitis (30,31). Het onderliggende mechanisme van HVZ is atherosclerose. In dit verband is het bijzonder interessant dat CD14 het mogelijk maakt dat LPS gebonden kan worden aan het LPS binding-eiwit (LBP); het LPS-CD14-LBP complex kan endotheelcellen en gladde spiercellen direct activeren (32,33), wat leidt tot verhoogde expressie van celadhesie moleculen. Hierdoor wordt de procoagulante activiteit in bloedvaten verhoogd en de ontstekingsreacties binnenin en rondom de atherosclerotische laesies verergert (34). Gebaseerd op onze resultaten uit **Hoofdstuk 4**, waar verhoogde sCD14 waardes bij parodontitis werden aangetoond, in samenhang met verhoogde CRP waarden en aantallen leukocyten, zouden verhoogde sCD14 spiegels in het bloed kunnen leiden tot een verhoogde activiteit binnenin de atherosclerotische plak bij patiënten met een risico voor HVZ. Wij veronderstellen dat sCD14-gemedieerde signalering één van de routes is die leidt tot verhoogde atherogene activiteit en daardoor tot een verhoogd risico voor HVZ bij parodontitis patiënten.

Niet alleen PMNs en monocytten zijn in staat tot interactie met bacteriën, maar ook bloedplaatjes reageren op bacteriën door middel van uitscheiding van antimicrobiële

eiwitten (35), en de expressie van proinflammatoire receptoren (36). In **Hoofdstuk 5** en **6** hebben we de activeringsstatus van circulerende bloedplaatjes bij parodontitis patiënten geanalyseerd, alsmede de reactie van de plaatjes op parodontale pathogenen en de interactie tussen bloedplaatjes, PMNs en monocytten tijdens stimulatie met bacteriën. Parodontitis patiënten lieten een verhoogde activering van de plaatjes zien, dat werd aangetoond door de verhoogde plasma waarden van P-selectine en de verhoogde expressie van de glycoproteïne IIb-IIIa. P-selectine en de glycoproteïne IIb-IIIa worden bij activering van bloedplaatjes in hoge mate tot expressie gebracht en zijn verantwoordelijk voor de hechtende en aggregerende eigenschappen van bloedplaatjes. P-selectine wordt enkele minuten na activering uitgescheiden door bloedplaatjes en wordt in het plasma teruggevonden als oplosbaar (s)P-selectine (37). Wij vonden dat de activering van de bloedplaatjes intenser was bij parodontitis patiënten naarmate de ziekte ernstiger was, dus “dosis” afhankelijk was.

Bovendien hebben we in **Hoofdstuk 6** laten zien dat bloedplaatjes van parodontitis patiënten gevoeliger zijn voor orale bacteriën dan bloedplaatjes van parodontaal gezonde personen. Als reactie op *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* en *S. sanguis*, maar niet op *T. forsythia*, brachten de bloedplaatjes van patiënten meer P-selectine tot expressie dan de bloedplaatjes van controles. Bovendien werden er, *ex vivo*, als reactie op de genoemde paropathogene bacterië, meer bloedplaatjes-monocyt complexen gevormd met het bloed van patiënten, dan met bloed van controles. In een fagocytose experiment, fagocyteerden bloedplaatjes-PMN- en bloedplaatjes-monocyt complexen meer bacteriën dan bloedplaatjes-vrije cellen, wat suggereert dat de complexen geactiveerde cellen bevatten.

Parodontitis is een aandoening waarbij, door ulceratie van het pocketepitheel, beperkte, maar desalniettemin frequente bacteremiën voorkomen tijdens normale activiteiten zoals kauwen of tanden poetsen (38,39). Deze bacteremiën zijn de oorzaak van endotoxemia en een chronische systemische ontstekingsreactie bij parodontitis patiënten (40,31,19). Uit epidemiologisch onderzoek is gebleken dat parodontitis geassocieerd is met een verhoogd risico op hartinfarcten en beroerte (29), maar de hiervoor verantwoordelijke mechanismen zijn nog onduidelijk. Gezien onze resultaten, denken wij dat de pathologische processen bij parodontitis o.a. resulteren in de activering van bloedplaatjes en monocytten, een steeds terugkerend proces tijdens elke bacteremie bij parodontitis. Geactiveerde bloedplaatjes produceren grote hoeveelheden proinflammatoire mediators afkomstig vanuit hun alfa-granules en “dense-body” systemen. Bovendien komen meer receptoren tot expressie. Na activering van bloedplaatjes induceren de

vrijgekomen proinflammatoire mediators en de receptoren, de hechting van plaatjes aan de endotheelcellen die de bloedvatwand bekleeden (36). Eenmaal gehecht, creëren de bloedplaatjes een platform waarop monocytten kunnen rollen en sterk hechten, hetgeen leidt tot een verhoogde monocyten rekrutering. Monocyten in de subendotheliale ruimte gaan overmatig intracellulair lipoproteïnen opnemen, wat leidt tot accumulatie van intracellulaire vetdruppels en formatie van schuimcellen. Deze functionaliteit maken geactiveerde bloedplaatjes en monocytten essentiële deelnemers in zowel trombose als atherogenese en wij suggereren dan ook dat dit, in ieder geval gedeeltelijk, de epidemiologische relatie tussen HVZ en parodontitis kan verklaren.

Het is tot op heden onduidelijk of de verhoogde bloedplaatjes reactiviteit bij parodontitis patiënten intrinsiek is, het resultaat van een specifieke genetische opmaak, of reactief is, dat wil zeggen het resultaat van priming door bacteriële producten afkomstig uit de parodontale pockets of door de cytokines die geproduceerd worden als gevolg van de systemische ontstekingsreactie in parodontitis. Verder onderzoek, waarbij de mate van plaatjesactivering en de reactiviteit worden vastgesteld na succesvolle behandeling van parodontitis, zal hier meer duidelijkheid over kunnen verschaffen. Belangrijk is in dit verband dat een interventie studie liet zien dat de behandeling van patiënten met parodontitis resulteert in een verbeterde endotheliale functie (41); de biologische basis van deze verbetering van de vasculaire conditie is tot op heden nog onduidelijk. Een afname in de mate van bloedplaatjes activering zou dit echter gedeeltelijk kunnen verklaren.

Tot slot

In dit proefschrift hebben we de reactiviteit van PMNs, monocytten en bloedplaatjes onderzocht. Voorgaande studies hebben aangetoond dat early-onset parodontitis patiënten o.a. gekarakteriseerd worden door het FcγRIIa^{131H/H} genotype en door de subgingivale kolonisatie met *A. actinomycetemcomitans*. In een studie in dit proefschrift vertoonden de FcγRIIa^{131H/H} genotype patiënten hyperactieve PMNs in functionele assays waarbij *A. actinomycetemcomitans* bacteriën werden gebruikt als stimuli. Voor de FcγRIIa varianten is de origine duidelijk genetisch en zal de therapeutische aanpak meer in de richting gaan van preventie van parodontitis; pro-actief genetische screening op vatbaarheid voor parodontitis ligt wellicht in het verschiet.

Daarnaast hebben we aangetoond dat bloedplaatjes en monocytten van parodontitis patiënten gevoeliger zijn voor activering door orale bacteriële soorten, zoals *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* en *S. sanguis*, dan cellen van gezonde controles.

Parodontale therapie resulteert zowel in een afname van de hoeveelheid bacteriën in de parodontale pockets, als in een afname van de systemische ontstekingsreactie. Gegeven de activiteit van bloedplaatjes en monocytten in trombotische processen en atherosclerose, kan parodontale therapie een toegevoegde waarde hebben, waarbij niet alleen de mond gezondheid van de patiënt verbetert, maar ook het algemene risico voor een myocard infarct en beroerte wellicht afneemt.

REFERENTIES

- 1 **Figueredo CM, Gustafsson A, Asman B, Bergstrom K.** 1999. Increased release of elastase from in vitro activated peripheral neutrophils in patients with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* **26**:206-211.
- 2 **Gustafsson A and Asman B.** 1996. Increased release of free oxygen radicals from peripheral neutrophils in adult periodontitis after Fc delta-receptor stimulation. *J Clin Periodontol* **23**:38-44.
- 3 **Matthews JB, Wright HJ, Roberts A, Cooper PR, Chapple IL.** 2007. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin Exp Immunol* **147**:255-264.
- 4 **Loos BG, Leppers-Van de Straat FG, Van de Winkel JG, van der Velden U.** 2003. Fcgamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* **30**:595-602.
- 5 **Wolf DL, Neiderud AM, Hinckley K, Dahlen G, van de Winkel JGJ, Papapanou PN.** 2006. Fcgamma receptor polymorphisms and periodontal status: a prospective follow-up study. *J Clin Periodontol* **33**:691-698.
- 6 **Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H.** 2002. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46**:2578-2586.
- 7 **Wijngaarden S, van Roon JAG, Bijlsma JWJ, van de Winkel JGJ, Lafeber FPJG.** 2003. Fc{gamma} receptor expression levels on monocytes are elevated in

-
- rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford)* **42**:681-688.
- 8 **Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW.** 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**:3170-3176.
 - 9 **Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S.** 2000. CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* **121**:566-570.
 - 10 **Kanaya S, Nemoto E, Ogawa T, Shimauchi H.** 2004. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides induce maturation of dendritic cells with CD14+CD16+ phenotype. *Eur J Immunol* **34**:1451-1460.
 - 11 **van der Velden U, Abbas F, Van Steenberghe TJ, De Zoete OJ, Hesse M, De Ruyter C, De Laat VH, de Graaff J.** 1989. Prevalence of periodontal breakdown in adolescents and presence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subjects with attachment loss. *J Periodontol* **60**:604-610.
 - 12 **Garred P, Madsen HO, Svejgaard A, Michaelsen TE.** 1999. Mannose-binding lectin and meningococcal disease. *Lancet* **354**:336-
 - 13 **Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, Sjöholm AG, Fugger L, Jensenius JC.** 2003. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med* **349**:554-560.
 - 14 **Agnese DM, Calvano JE, Hahn SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF.** 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* **186**:1522-1525.
 - 15 **Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV.** 1999. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* **179**:721-724.

- 16 **Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A.** 1994. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* **21**:125-131.
- 17 **Ulevitch RJ and Tobias PS.** 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**:437-457.
- 18 **Maliszewski CR.** 1991. CD14 and immune response to lipopolysaccharide. *Science* **252**:1321-1322.
- 19 **Pussinen PJ, Tuomisto K, Jousilahti P, Havulinna AS, Sundvall J, Salomaa V.** 2007. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**:1433-1439.
- 20 **Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D.** 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis* **36**:319-325.
- 21 **Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V.** 2004. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* **350**:1387-1397.
- 22 **Keaney JF, Jr. and Vita JA.** 2002. The value of inflammation for predicting unstable angina. *N Engl J Med* **347**:55-57.
- 23 **Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L.** 2000. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during instability in coronary artery disease. *N Engl J Med* **343**:1139-1147.
- 24 **Ikonomidis I, Stamatelopoulos K, Lekakis J, Vamvakou GD, Kremastinos DT.** 2008. Inflammatory and non-invasive vascular markers: the multimarker approach for risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis* **199**:3-11.

-
- 25 **Rana JS, Boekholdt SM, Ridker PM, Jukema JW, Luben R, Bingham SA, Day NE, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT.** 2007. Differential leucocyte count and the risk of future coronary artery disease in healthy men and women: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Intern Med* **262**:678-689.
- 26 **Danesh J, Collins R, Peto R.** 1997. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* **350**:430-436.
- 27 **Lowe GD.** 2001. The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease: an overview. *Ann Periodontol* **6**:1-8.
- 28 **Maseri A, Biasucci LM, Liuzzo G.** 1996. Inflammation in ischaemic heart disease. *BMJ* **312**:1049-1050.
- 29 **Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA.** 2003. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **95**:559-569.
- 30 **Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG.** 2008. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* **35**:277-290.
- 31 **Loos BG.** 2005. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* **76**:2106-2115.
- 32 **Pugin J, Ulevitch RJ, Tobias PS.** 1995. Activation of endothelial cells by endotoxin: direct versus indirect pathways and the role of CD14. *Prog Clin Biol Res* **392**:369-373.
- 33 **Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U, Schluter C, Ernst M, Schutt C, Flad HD.** 1995. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* **63**:1020-1026.
- 34 **Lo SK, Cheung A, Zheng Q, Silverstein RL.** 1995. Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *J Immunol* **154**:4768-4777.
- 35 **Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D.** 2006. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* **4**:445-457.

- 36 **Klinger MH and Jelkmann W.** 2002. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* **22**:913-922.
- 37 **Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR.** 1996. In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *PNAS* **93**:11877-11882.
- 38 **Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P.** 2006. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* **33**:401-407.
- 39 **Geerts SO, Nys M, De MP, Charpentier J, Albert A, Legrand V, Rompen EH.** 2002. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J Periodontol* **73**:73-78.
- 40 **D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D, Tonetti MS.** 2004. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* **83**:156-160.
- 41 **Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P, Deanfield J.** 2007. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* **356**:911-920.