

5. *Rapport Gezondheidsraad* (1970): Advies inzake de medisch-toxicologische en tandheelkundige aspecten van het fluorideren van drinkwater.
6. *Barr, J. H.* (1949): Some characteristics of caries on the proximal surfaces of teeth. *J. Dent. Res.* 28: 466-482.
7. *Doyl, J., Horowitz, H. S.* (1970): Influence of extracted teeth on D.M.F. surface increments in clinical trials of caries preventives. *J. Dent. Res.* 49: 1417-1422.
8. *Backer Dirks, O., Amerongen A. J. van, Winkler, K. C.* (1953): Cariësonderzoek III. Een reproduceerbare methode voor de cariësbepaling. *Tijdschr. v. Tandheelk.* 60: 869-881.
9. *Backer Dirks, O., Kwant, G. W.* (1954): A reproducible method for cariesevaluation. *Tijdschr. v. Tandheelk.* 61: 891-904.
10. *Houwink, B.* (1963): Tandsteen bij kinderen. (Academisch proefschrift.)
11. *Backer Dirks, O., Kwant, G. W., Klaassen, C. B.* (1957): A reproducible method for cariesevaluation V. Pit and fissurecariës of molars and premolars. *Tijdschr. v. Tandheelk.* 64: 77-85.
12. *Backer Dirks, O.* (1966): Posteruptive changes in dental enamel. *J. Dent. Res.* 45: 503-511.
13. *Barr, J. H. et al.* (1957): Incidence of caries at different locations on the teeth. *J. Dent. Res.* 36: 537-545.
14. *Backer Dirks, O.* (1967): The relation between the fluoridation of water and dental caries experience. *Int. Dent. J.* 17: 582-605.

Catharijnesingel 59,
Utrecht.

DE INTERACTIE VAN FORMALDEHYDE MET EIWITTEN EN ANDERE BIOLOGISCHE MATERIALEN

*Uit het laboratorium voor Materia Technica
van de Rijksuniversiteit te
Groningen.
Hoofd: Prof. Dr. J. Arends.*

BEHANDELING VAN NON-VITAAL PULPAWEEFSEL, EEN NIEUWE BENADERING

E. J. 's-GRAVENMADE

Inleiding

Bij gebitselementen met een necrotische kanaalinhoud vindt voortdurend penetratie van toxische stoffen – die ontstaan door activiteit van micro-organismen – en wefselafbraakprodukten plaats via het foramen apicale, laterale kanalen en ramificaties in het peri-apicale weefsel. Deze stoffen kunnen aanleiding geven tot peri-apicale ontstekingen. Strikt genomen zou dus al het necrotische weefsel verwijderd moeten worden. Dit is echter niet mogelijk in verband met accessorische kanalen en ramificaties. Om deze reden is getracht een middel te vinden om het necrotische weefsel dat mechanisch niet kan worden verwijderd, onschadelijk te maken. Er bestaat een omvangrijke literatuur over deze behandeling; onder andere Buckley (1905) en in ons land De Boer (1966) hebben het formocresol hiervoor aanbevolen. Formocresol is een mengsel van gelijke delen formaline en meta-cresol (ook wordt tricresol gebruikt, een mengsel van ortho-, meta- en para-cresol). Het formaline is een 35%-ige oplossing van formaldehyde in water en zou behalve het doden van micro-organismen tevens de functie hebben, toxische stoffen om te zetten in minder

schadelijke produkten (Wijk, 1971). Het cresol heeft behalve goede desinfecterende eigenschappen het belangrijke voordeel met formaldehyde een halfacetaat te vormen, waardoor de reactiviteit van formaldehyde wordt gereduceerd. Doordat penetratie van een desinfectans in het dentine van het element mogelijk is en uittreden via het tandwortelcement niet uitgesloten kan worden (Hampson en Atkinson, 1964), is het evident dat een toegepast desinfectans niet schadelijk mag zijn voor de peri-apicale weefsels. Overmatig gebruik van formaldehyde moet dan ook om deze reden worden afgeraden (Wesley, 1970).

De meeste endodontische technieken zijn, alvorens een hermetisch sluitende kanaalvulling aan te brengen, gericht op het elimineren van bacteriën (Seltzer, 1971; Lamers en The, 1970). Nauwelijks wordt aandacht geschonken aan de belangrijkste eigenschap van formaline: de reacties van dit preparaat met non-vitaal pulpaweefsel. Hierdoor ontstaan uit eiwitten metabolisch inerte produkten, die als voedingsbodem voor micro-organismen uiterst ongeschikt zijn. Het formaldehyde dient dan ook

primair als een fixatiemiddel van eiwitmateriaal gezien te worden.

In dit overzicht zal in het bijzonder aandacht worden geschonken aan de reacties van formaldehyde met eiwitten zoals die voorkomen in het non-vitale pulpaweefsel.

Eiwitten in de non-vitale pulpa

De pulpa is voornamelijk opgebouwd uit een losmazig bindweefselstroma waarin bloedvaten, lymfevaten en zenuwvezels ingebed liggen. Zowel in de vitale als in de non-vitale pulpa zijn de voornaamste chemische verbindingen de biologisch belangrijke macromoleculen: collageen, mucopolysacchariden, glycogeen, enzymen en nucleïnezuren, en als voornaamste kleine moleculen: cholesterol, fosfolipiden, lipiden, kooldioxyde en zwavelwaterstof.

De eiwitten vormen voor de eventueel aanwezige micro-organismen het voedselsubstraat. Om de opname mogelijk te maken moeten deze eiwitten worden afgebroken tot kleinere eenheden. Proteolytische enzymen afkomstig van de micro-organismen leiden tot desintegratie van deze eiwitten.

De intermediaire afbraakproducten die ontstaan met progressief kleiner wordende ketenlengte zijn: proteïnen → proteosen → peptonen → polypeptiden → oligopeptiden → aminozuren.

Door modificatie van bepaalde aminozuren in het metabolisme van bacteriën ontstaan aminen, die een chemische irritatie uitoefenen op peri-apicaal weefsel, waardoor een biochemische beschadiging kan optreden. Deze beschadiging zal dikwijls een ontstekingsreactie ten gevolge hebben. Enkele van de irriterend werkende aminen zijn putrescine (1,4-diaminobutaan) uit ornithine, cadaverine (1,5-diaminopentaaan) uit lysine, indol en skatol uit tryptofaan, histamine uit histidine, etc.

Naast het ontstaan van metabole aminen kunnen tijdens de groei van sommige micro-organismen in het weefsel exotoxinen ontstaan.

Onafhankelijk van deze bacteriële processen kan autolyse een belangrijke factor zijn bij de desintegratie van het eiwitmateriaal.

Formaldehyde

Formaldehyde is een kleurloos gas met een scherp prikkelende geur. Het is het eenvoudigste aldehyde, dat goed oplosbaar is in water en hierin reageert als een zeer zwak zuur. In dit waterige milieu kan het tot polymerisatie overgaan. Om te beletten dat formaldehyde snel polymeriseert, wordt een hoeveelheid methanol toegevoegd (Walker, 1964).

Uit spectroscopisch onderzoek*) is gebleken, dat in waterige oplossingen het formaldehyde hoofdzakelijk als hydraat aanwezig is, dus als methyleenglycol $H_2C(OH)_2$.

Formaldehyde is chemisch een zeer reactieve stof. Veelvuldige toepassing vindt het bij het elimineren van toxinen, die na inwerking van de genoemde verbinding overgaan in toxoïden (French en Edsall, 1945; Murphy, 1967) en fixatie van weefsel voor microscopisch onderzoek.

In waterige oplossing werkt het als een sterk desinfectans. Van deze laatste eigenschap wordt in de endodontie gebruik gemaakt.

Interactie van formaldehyde met eiwitten

In tegenstelling tot de algemeen aanvaarde mening dat de belangrijkste eigenschappen van formaldehyde in formocresol de desinfecterende werking en het omzetten van de gevormde toxische stoffen in minder schadelijke producten zijn, is naar onze mening de reactie van formaldehyde met het eiwitmateriaal primair. Zoals reeds uiteen is gezet worden hierbij metabolisch inerte stoffen gevormd. Ter illustratie zullen we een aantal belangrijke reacties bespreken.

Het is bekend dat eiwitten opgebouwd zijn uit α , L-aminozuren. Deze verbindingen zijn gekenmerkt door een zure ($-COOH$) en een basische ($-NH_2$) groep en een restgroep R. De algemene structuur wordt gegeven door $H_2N-CH-COOH$.



De restgroep R is bepalend voor het soort aminozuur en kan bij de natuurlijk voorkomende aminozuren 20 verschillende atoomgroepen voorstellen. Het zijn in het bijzonder de restgroepen met een amino-, hydroxyl-, sulfhydryl-, imino-, amide-, of carboxyl-groep, die primair reageren met het chemisch zeer reactieve formaldehyde. Verder zijn reacties mogelijk met reactieve waterstofatomen, aromatische ringen en peptide-bindingen. Door deze reacties worden essentiële zijgroepen geblokkeerd, waardoor enzymatische afbraak van de eiwitmoleculen niet meer mogelijk is. Een stabilisatie van de eiwitmoleculen wordt op analoge wijze verkregen door de vorming

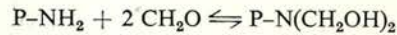
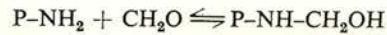
*) Oplossingen van formaldehyde in water met een concentratie van 1 molair of meer missen de karakteristieke absorptieband van de carbonylgroep bij 280 nm. Raman spectroscopisch onderzoek geeft geen duidelijke vibratiefrequentie bij 1700 cm^{-1} . Deze feiten, gecombineerd met de geringe vluchtigheid van formaldehyde in waterige oplossingen, suggereren dat de *dehydrateerde* vorm van formaldehyde in dit milieu domineert.

van intra- en intermoleculaire bindingen. De voornaamste aminozuren met een dergelijke reactieve groep zijn in onderstaande tabel gegeven.

Aminozuur	Reactieve groep
Lysine	$-\text{NH}_2$
Arginine	$-\text{NH}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{NH} \end{array}$
Histidine	$-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}-\text{N} \\ \searrow \text{CH} \\ \text{N} \\ \text{H} \end{array}$
Glutamine, asparagine	$-\text{CONH}_2$
Cysteïne	$-\text{SH}$
Tyrosine	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$
Tryptofaan	$-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}-\text{H}$

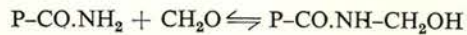
De mate waarin deze groepen reageren is afhankelijk van een aantal omstandigheden, zoals zuurtegraad en temperatuur. Vindt de reactie plaats met de zijgroepen van een eiwitmolecuul, dan speelt ook de conformatie van het eiwit een rol.

De interactie van formaldehyde met deze restgroepen is uitvoerig beschreven door French en Edsall (1945), Bowes (1948), Fraenkel-Conrat en Mecham (1949) en in het bijzonder voor het specifieke eiwit-collageen door Gustavson (1956). De meest voorkomende reactie van formaldehyde is die met de ϵ -aminogroep ($-\text{NH}_2$), die voorkomt in lysine. Er ontstaan, afhankelijk van het aantal reagerende moleculen formaldehyde, instabiele methylol-verbindingen volgens de onderstaande reacties:

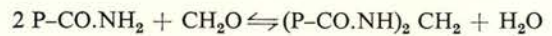


Hierin stelt P de rest van het eiwit voor en CH_2O het formaldehyde. De vorming van de aminomethylol-verbindingen vindt momentaan plaats.

Is een amidegroep ($-\text{CO.NH}_2$) aanwezig, zoals in glutamine en asparagine, dan kunnen op overeenkomstige wijze aminomethylol-verbindingen gevormd worden volgens:

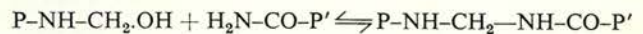
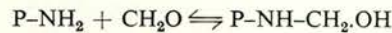


In deze laatste verbinding is de $-\text{OH}$ groep zeer reactief en geeft een condensatiereactie, waardoor methyleendiamiden gevormd worden:



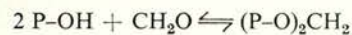
De laatste verbindingen zijn zeer stabiel.

Een andere reactie die zich voordoet is, die waarbij formaldehyde eerst reageert met aminogroepen, waarna het gevormde product in een volgreactie met amidegroepen kan reageren:



Op deze wijze kan een cyclische structuur ontstaan of kan een koppeling van verschillende eiwitmoleculen optreden (zgn. „cross linking”).

Formaldehyde reageert op analoge wijze met hydroxyl-groepen ($-\text{OH}$), die voorkomen in suikergebonden eiwitten. De gevormde producten worden respectievelijk hemiacetalen en acetalen genoemd:

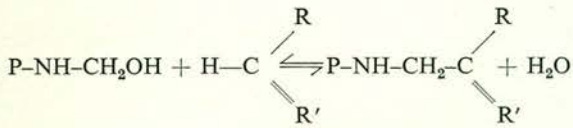


De hemiacetalen zijn zeer instabiel, terwijl de acetalen zowel in neutraal als alkalisch milieu stabiel zijn.

Met de sulfhydryl-groep ($-\text{SH}$) krijgen we analoge reacties, die gemakkelijker plaatsvinden en stabiel zijn dan hun zuurstofanalogen.

Tot slot beschouwen we een belangrijke groep van eiwit-formaldehyde reacties, die plaatsvinden volgens het

Mannich-type (Fieser en Fieser, 1956). Deze reactie betreft de condensatie van een actief H-atoom naast een dubbele binding en een secundaire amine volgens de onderstaande algemene reactie:



De restgroepen die volgens de Mannich-reactie reageren zijn de imidazolgroep van histidine, de fenolgroep van tyrosine en de indolgroep van tryptofaan. Het gevormde product is stabiel.

De hier besproken individuele reacties van formaldehyde met restgroepen van aminozuren in eiwitten vinden alle onder overeenkomstige omstandigheden plaats. Het resultaat is dan ook dat de combinatie van intra- en inter-moleculaire reacties en het blokkeren van de besproken restgroepen een complex eindproduct opleveren.

Discussie

Bij de voorafgaande beschouwing is besproken dat uit necrotisch pulpweefsel toxische stoffen worden gevormd, die via het foramen apicale in contact kunnen komen met peri-apicaal weefsel. Zij kunnen zowel door extra-cellulaire enzymen, afkomstig van micro-organismen, als door autolyse ontstaan. Deze producten zullen een chemische irritatie van het peri-apicale weefsel ten gevolge hebben, terwijl zij bij voldoende hoge concentratie een ontsteking kunnen opwekken. Exotoxinen afkomstig van micro-organismen, alsmede reactieproducten die uit het ontstoken weefsel ontstaan, hebben op overeenkomstige wijze een chemische irritatie tot gevolg.

Preventie van deze irritatie is mogelijk door de afbraak van het aanwezige eiwitmateriaal te voorkomen. Voor de praktijk betekent dit dat *primair* de kanaalinhoud moet worden gefixeerd. De fixatie berust op het metabolisch inert maken van eiwitten door bepaalde restgroepen van de aminozuren in deze eiwitten te blokkeren. Er worden bij deze reacties tevens stabiliserende inter- en intramoleculaire bindingen gevormd. Bij genoemde fixatie treedt per definitie desinfectie op.

Deze zienswijze vormt een contrast met de huidige endodontische therapie, die primair gericht is op de desinfectie van de kanaalinhoud (Ingle, 1965; Grossman, 1970; Seltzer, 1971; Eggink, 1964). Bij desinfectie heeft namelijk géén fixatie plaats te vinden. Gebeurt de

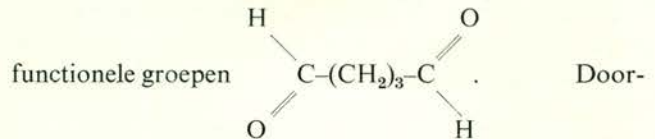
desinfectie met behulp van formaldehyde, dan treedt tevens fixatie op.

Producten, die géén fixerende werking bezitten, zoals metacresol in formocresol, chloorfenol-kamfer-mentol (ChKM), chloorfenol-kamfer-thymol (ChKT), en polyantibiotische pasta's zijn dan ook met het oog op het bovenstaande therapeutisch ongeschikt. De resultaten, die hiermee toch verkregen worden in de endodontie houden het gevaar van recidief in. Het gunstige effect, dat ook verkregen zou kunnen worden door *alleen* de wortelkanalen goed te ruimen – waardoor de kwantiteit van het beschikbare eiwitmateriaal sterk gereduceerd zou worden – houdt hetzelfde gevaar in.

Naast de fixerende eigenschappen van formaldehyde bestaat er evenwel gevaar voor chemische irritatie van het peri-apicale weefsel. Uit verrichte transportmetingen van formaldehyde vanuit afgesloten wortelkanalen is gebleken, dat bij gebruik van 1 μ l 25%-ige formaldehyde-oplossing binnen 15 minuten reeds een aantoonbare hoeveelheid vrij formaldehyde door het worteldentine gepenetreerd is.

Een ander bezwaar is dat het formaldehyde vele instabiele, reversibele bindingen met de besproken restgroepen vormt. Dit betekent dat de fixatie door deze stof van tijdelijke aard is. Om toch een redelijke fixatie te verkrijgen, moet er een overmaat formaldehyde aanwezig zijn en een lange inwerkingsduur bestaan. Dit brengt een vergroot gevaar voor penetratie met zich mee. Aan de lange inwerkingsduur tracht de praktizerende tandarts tegemoet te komen door de tijdsduur tussen twee zittingen op 14 dagen te stellen (Wijk, 1971). Uit verricht onderzoek blijkt echter, dat 3 dagen na het inbrengen van formaldehyde geen aantoonbare hoeveelheid formaldehyde meer in het element aanwezig is.

Om de bezwaren van formaldehyde te ondervangen zijn op ons laboratorium veelbelovende experimenten verricht met glutaardialdehyde. Dit aldehyde heeft twee



laatbaarheidsexperimenten als boven voor formaldehyde vermeld, gaven na insluiten van 10 μ l 25%-ige glutaardialdehyde-oplossing geen aantoonbare penetratie. Uit onderzoek van Bowes en Cater (1965) blijkt dat glutaardialdehyde meer intra- en intermoleculaire bindingen met eiwitten vormt en *stabiele* bindingen met de restgroepen aangaat. Dit onderzoek, dat in samenwerking met Drs. J. C. Wemes van de afdeling Endodontie

plaatsvindt, zal binnenkort worden afgesloten en gepubliceerd.

In het licht van voorgaande beschouwingen kan geconcludeerd worden, dat het glutaardialdehyde als therapeutikum in de endodontie waarschijnlijk belangrijke voordelen heeft boven formocresol.

De schrijver brengt dank aan de heren A. C. Lamers, Dr. J. D. van Willigen en Drs. J. C. Wemes voor hun waardevolle adviezen en stimulerende discussies.

Samenvatting:

Reacties van formaldehyde met eiwitten leiden tot metabool inerte producten, die als voedingsbodem voor micro-organismen ongeschikt zijn. Op grond hiervan wordt plausibel gemaakt, dat bij wortelkanaalbehandelingen *primair* gebruik gemaakt moet worden van een fixatiemiddel en géén desinfectans. Gezien de bezwaren tegen het toepassen van formaldehyde, als gevolg van de doorlaatbaarheid van deze stof in dentine, wordt het gebruik van glutaardialdehyde gunstiger geacht.

Summary:

Title: Interaction of formaldehyde with proteins and other biological materials.

Reactions of formaldehyde with proteins result in metabolic inert products, which are unsuitable as a culture medium. Therefore, in this study it is indicated that in endodontic treatments *in the first place* a fixative should be used and no disinfectant. As application of formaldehyde has many disadvantages, such as the penetration of this compound into dentine, the use of glutardialdehyde is considered more favourably.

Literatuur:

1. Boer, J. G. de (1966): Endodontie voor de praktijk. N.T.v.T. 73: 167.
2. Bowes, J. H. (1948): The reaction of formaldehyde with proteins and amino acids, with special reference to formaldehyde tanning. Progress in Leather Science, B.L.M.R.A., London, p. 501.
3. Bowes, J. H., Cater, C. W. (1965): Cross-linking of collagen. J. Appl. Chem. 15: 296.
4. Eggink, C. O. (1964): Resultaten van endodontische behandelingen beoordeeld volgens een gestandaardiseerde methode. Academisch proefschrift, Utrecht.
5. Fieser, L. F., Fieser, M. (1956): Organic chemistry. Reinhold Publ. Co., New York, p. 704.
6. Fraenkel-Conrat, H., Mecham, D. K. (1949): The reaction of formaldehyde with proteins. J. Biol. Chem. 177: 477.
7. French, D., Edsall, J. T. (1945): The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. Adv. Protein Chem. II, p. 277.
8. Grossman, L. I. (1965): Endodontic practice. 7th Ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
9. Hampson, E. L., Atkinson, A. M. (1964): The relation between drugs used in root canal therapy and the permeability of the dentine. Brit. Dental J. p. 546.
10. Ingle, J. I. (1965): Endodontics. Lea and Febiger, Philadelphia.
11. Lamers, A. C., The, S. D. (1970): Formocresol als wortelkanaaldesinfectans. N.T.v.T. 77: 86.
12. Murphy, S. G. (1967): Tetanus toxin and antigenic derivatives. J. Bact. 94: 586.
13. Seltzer, S. (1971): Endodontology. Biologic considerations in endodontic procedures. McGraw-Hill, New York.
14. Walker, J. F. (1964): Formaldehyde. Third edition. Reinhold Publishing Corporation, New York.
15. Wijk, P. H. (1971): Behandeling non-vitale pulpa met formocresol. Academisch proefschrift, Groningen. P. 25.
16. Wesley, D. J. (1970): The quantitation of formocresol as a root canal medicament. Or. Surg. Med. Path. 29: 603.

Adres: Dr. E. J. 's-Gravenmade,
Antillenstraat 11-13,
Groningen.

ACTIEVE CARIËSPROFYLAXIS DOOR FLUORIDE-BEVATTEND ZOUT

Y. J. VAN DER MEULEN

Het moet – zou men zeggen – langzamerhand wel tot alle mensen zijn doorgedrongen dat verschillende, zeer goed begaanbare wegen tot hetzelfde doel: cariëspreventie, leiden. Immers iedereen weet dat op het gebied van voeding, mondhygiëne en tijdige gebitscontrole zeer veel zou zijn te bereiken. Toch blijkt dat er in dit opzicht nog altijd veel behoefte aan regelmatige voor-

lichting, liever gezegd: opvoeding bestaat. Deze dient, wat de jeugd betreft, door de school, resp. de schooltandarts te worden gegeven. Ook de ziekenfondsen hebben in deze een opvoedende taak: zij zijn er mede van op de hoogte dat preventieve maatregelen goedkoper zijn dan curatieve hulp.

Het is voldoende bekend dat fluoride de weerstand