

Uitgebreid onderzoek zal nog nodig zijn alvorens met enige zekerheid een uitspraak over de brekingsindex van glazuurapatiet zal kunnen worden gedaan.

Summary:

Title: Research into the birefringence of human enamel.

The birefringence of human dental enamel was studied using polarized light and imbibition of compensating liquids. It was found that the negative total path difference can be increased by treatment of the enamel with protein removing substances.

Indications are that the index of refraction of enamel apatite is at least 1.64.

Literatuur:

1. Schmidt, W. J., Keil, A. (1971): Polarizing microscopy of dental tissues. Pergamon Press 1971 Oxford, England.
2. Houwink, B. (1971): The effect of organic solvents on the results of imbibition experiments in sound and carious dental enamel. Caries Res 5: 279-289.

Juli 1973.

Adres: Prof. Dr. B. Houwink,
De Boelelaan 1115,
Amsterdam.

INVLOED VAN DIFOSFONATEN OP DE ANORGANISCHE PYROFOSFATASE BIJ ZICH ONTWIKKELENDE HAMSTERMOLAREN

J. H. M. WÖLTGENS

*Uit het laboratorium
voor Preventieve Tandheelkunde
(afd. Preventieve
en Sociale Tandheelkunde)
van de Vrije Universiteit te Amsterdam.
Hoofd: Prof. Dr. B. Houwink.*

Anorganisch pyrofosfaat (PP_i) is een remmer van de verkalking (Fleisch, 1964) die niet alleen de formatie van hydroxy-apatiet, maar ook het oplossen van de kristallen kan tegengaan (Fleisch et al., 1966). Deze remmer wordt nu in gebieden waar de verkalking optreedt gesplitst door het enzym de alkalische fosfatase, waarvan Eaton en Moss (1968) voor bot en wij (Wöltgens et al., 1970) voor de tanden hebben kunnen aantonen dat het een pyrofosfatase activiteit bezit.

Doordat het PP_i gesplitst kan worden door enzymen en bovendien chemisch gezien erg labiel is, zijn afysiologisch hoge doses nodig voor het voorkomen van ziektebeelden zoals bijv. aderverkalking (Schibler et al., 1968). Daarom is er gezocht naar andere stoffen die gelijke werking als het pyrofosfaat bezitten, maar die meer resistent zijn tegen chemische en enzymatische hydrolyse. Door het centraal zuurstofatoom in de P-O-P-binding van het pyrofosfaat te vervangen door een koolstofatoom (d.w.z. P-C-P-binding) was dit inderdaad mogelijk. Zulke stoffen worden difosfonaten genoemd. Deze difosfonaten bleken in zeer lage concentratie niet alleen de vorming (Francis et al., 1969), maar ook het oplossen van hydroxy-apatietkristallen te remmen (Fleisch et al., 1969).

Het bleek mogelijk te zijn de difosfonaten met succes toe te passen tegen botziekten. Bovendien bleken difosfonaten tandsteenvorming (Stürzenberger

et al., 1971, Mühlemann et al., 1970) enerzijds en het cariësproces anderzijds te remmen (Regolati en Mühlemann, 1970).

Terwijl het effect van difosfonaten op de kristalvorming en oplossing uitgebreid bestudeerd is, is het effect van difosfonaten op de enzymactiviteit nauwelijks onderzocht. Omdat er een grote analogie bestaat tussen de difosfonaten en het pyrofosfaat, wat het eigenlijke substraat is voor het enzym, werd de invloed van difosfonaten op de anorganische pyrofosfatase bestudeerd. In deze studie werd uitgegaan van gelyofiliseerd homogenaat van 3 dagen oude hamstermolaren volgens de methoden die elders beschreven staan door Wöltgens et al. (1970). In de afwezigheid van PP_i kon geen enzymatische hydrolyse worden waargenomen van de drie difosfonaten die getest zijn, d.w.z. MDP, CL_2MDP en EHDP. Zij dienen dus niet als substraat voor het enzym. Toevoeging van deze stoffen in concentraties boven de $10^{-4}M$ aan het medium, veroorzaakte een remming van de pyrofosfatase activiteit. Deze remming kan op drie manieren worden verklaard:

1. Het difosfonaat complexeert Mg^{2+} dat nodig is voor de vorming van $MgPP_i^{2-}$, wat het eigenlijke substraat is voor het enzym.
2. Het difosfonaat verdringt het substraat PP_i van de

plaats op het actieve centrum door de overeenkomst in structuur van het enzym en blokkeert daardoor de werking van het enzym.

3. Het difosfonaat vormt een bepaalde verbinding met andere bivalente kationen dan Mg^{2+} , die als cofactoren nodig zijn voor de enzymactiviteit.

In voorafgaande experimenten (Wöltgens et al., 1971) waren we niet in staat de remmende werking van de difosfonaten door het complexeren van Mg te verklaren en alleen voor het difosfonaat EHDP slechts ten dele door competitieve remming van het ideale substraat $MgPP_i^{2-}$ met het difosfonaat $MgEHDP^{2-}$. Veelmeer bleek mogelijkheid 3 uit de volgende experimenten.

Ethyleen-diamine-tetra-azijnzuur (EDTA) bleek namelijk ook in staat de pyrofosfatase te remmen en de remming veroorzaakt door 0.1 mM EDTA kon teniet worden gedaan door equimolaire concentraties Zn^{2+} en Co^{2+} , die waarschijnlijk als cofactoren van het enzym werken. Vervolgens is nagegaan of de remming door difosfonaten eveneens door Zn^{2+} en Co^{2+} kon worden opgeheven. Daartoe werd de remmende werking van 1.65 mM MDP, Cl_2 MDP en EHDP en als vergelijk EDTA onderzocht in de aanwezigheid van 0.1 en 2 mM Zn^{2+} (fig. 1), respectievelijk 0.1 en 2 mM Co^{2+} (fig. 2). Ook hierbij bleek dat 0.1 mM Zn^{2+} de remmende werking in zijn geheel kon elimineren, terwijl 0.1 mM Co^{2+} de oorspronkelijke activiteit vrijwel geheel kon herstellen. Overmaat Zn^{2+} en Co^{2+} werken remmend.

Hieruit kon worden geconcludeerd dat difosfonaten MDP, Cl_2 MDP en EHDP de pyrofosfatase remmen door complexeren van Zn^{2+} en Co^{2+} die cofactoren zijn van het enzym. Zoals reeds eerder vermeld is, was gebleken dat EHDP naast de complexerende werking ook nog een remming veroorzaakt wanneer het wordt toegevoegd als $MgEHDP^{2-}$, door te werken als analogon van het $MgPP_i^{2-}$, wat het eigenlijke substraat is van het enzym.

Samenvattend kan worden gezegd dat difosfonaten naast de remmende werking direct op het hydroxyapatiet de verkalking ook indirect kunnen belemmeren door hun remmende werking op de pyrofosfatase activiteit. De remmende werking kan worden beïnvloed door de concentraties Zn^{2+} of Co^{2+} te wijzigen.

Samenvatting:

Difosfonaten beïnvloeden de verkalking direct door het voorkomen

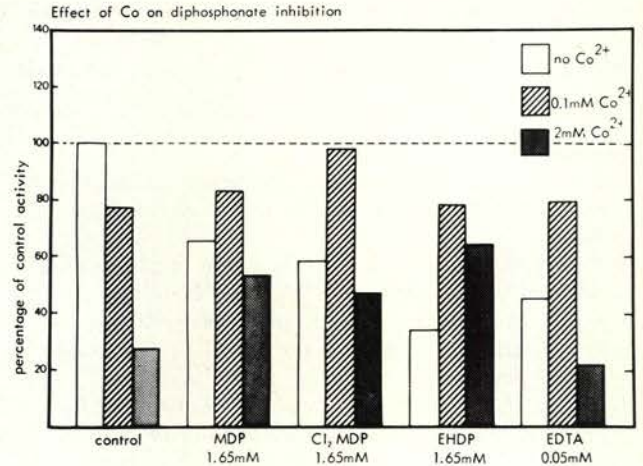


Fig. 1. Invloed van Zn^{2+} op de pyrofosfatase-activiteit in de aanwezigheid van MDP, Cl_2 MDP, EHDP (elk 1.65 mM) en EDTA (0.1 mM).

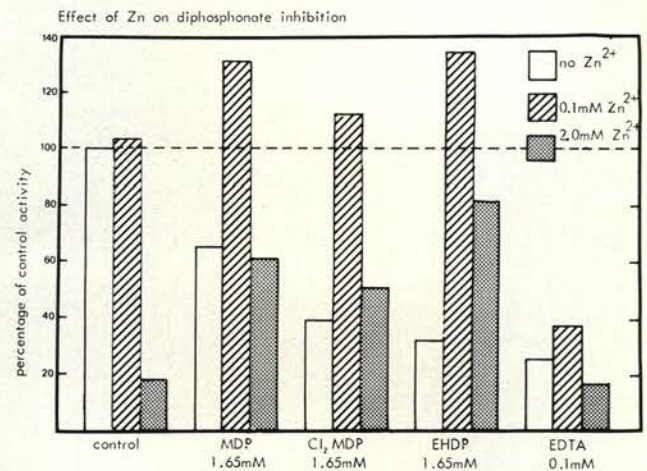


Fig. 2. Invloed van Co^{2+} op de pyrofosfatase-activiteit in de aanwezigheid van MDP, Cl_2 MDP, EHDP (elk 1.65 mM) en EDTA (0.05 mM).

van hydroxy-apatiet vorming en indirect door de remming van de anorganische pyrofosfatase.

De remming was hoofdzakelijk te danken aan de complexvorming van cofactoren van het enzym, Zn^{2+} of Co^{2+} .

Voor het difosfonaat EHDP bestaat er boven een competitie tussen $MgPP_i^{2-}$ en $MgEHDP^{2-}$.

Summary:

Title: Influence of diphosphonates on the inorganic pyrophosphatase.

Diphosphonates influence mineralisation directly by preventing hydroxy-apatite formation and indirectly by inhibiting the inorganic pyrophosphatase.

The inhibition is primarily due to the complexation of cofactors of the enzyme Zn^{2+} or Co^{2+} .

For EHDP more-over, there exists a competition between $MgPP_i^{2-}$ and $MgEHDP^{2-}$.

Literatuur:

1. Eaton, R. H., D. W. Moss (1968): Partial purification and some properties of human bone alkaline phosphatase. *Enzymologia* 35: 31.
2. Fleisch, H. (1964): Role of nucleation and inhibition in calcification. *Clin Orthop Rel Res* 32: 170.
3. Fleisch, H., R. G. G. Russell, F. Straumann (1966a): Effect of pyrophosphatase on hydroxy-apatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 212: 901.
4. Fleisch, H., J. Maerki, R. G. G. Russell (1966b): Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxy-apatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 317.
5. Fleisch, H., R. G. G. Russell, H. D. Francis (1969): Disphosphonates inhibit hydroxy-apatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 165: 1262.
6. Francis, H. D., R. G. G. Russell, H. Fleisch (1969): Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals

in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 165: 1266.

7. Mühlemann, H. R., D. Bowles, A. Schait, J. B. Bernimoulin (1970): Effect of diphosphonate on human supragingival calculus. *Helv Odont Acta* 14: 31.
8. Regolati, B., R. Schmid, H. R. Mühlemann (1970): Effects of diphosphonate and fluoride on caries, fluorine content and dissolution of rat molars. *Helv Odont Acta* 14: 37.
9. Schibler, D., R. G. G. Russell, H. Fleisch (1968): Inhibition of pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vit. D_3 in rats. *Clin Sci* 35: 363.
10. Stürzenberger, O. P., J. R. Swancar, G. Reiter (1971): Reduction of dental calculus in humans through the use of a dentifrice containing a crystal-growth inhibitor. *J Periodontol* 42: 7416.
11. Wöltgens, J. H. M., S. L. Bonting, O. L. M. Bijvoet (1970): Relationship between alkaline phosphatase and inorganic pyrophosphatase activities in calcifying hamster molars. *Calcif Tiss Res* 5: 333.
12. Wöltgens, J. H. M., S. L. Bonting, O. L. M. Bijvoet (1971): Influence of sodium-ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate and Mg^{2+} on the inorganic pyrophosphatase. *Isr J Med Sci* 7: 406.

Juli 1973.

Adres: Dr. J. H. M. Wöltgens,
De Boelelaan 1115,
Amsterdam.

INDUCTIE VAN BINDWEEFSEL DOOR GETRANSPLANTEERDE TANDKIEMEN

J. C. BODEGOM

Uit de literatuur bekende experimenten (Hoffman, 1960; Ten Cate e.a., 1971; Klein, 1970) rechtvaardigen een nadere beschouwing en verder experimenteel onderzoek naar de mogelijkheid dat getransplanteerde tandkiemen omgevend bindweefsel induceren tot botvorming en tot een bepaalde oriëntatie van collagene vezels. Voor een beter inzicht in met tandkiemtransplantaties gepaard gaande verschijnselen, is een korte bespreking van immunologische en morfologische aspecten gewenst.

Immunologische aspecten

De resultaten met betrekking tot de overlevingskans van getransplanteerde tandkiemen lopen ver uiteen. Ivanyi en Vacek (1964) rapporteerden bij ratten een

*Uit de afdeling Orthodontie
van de Vrije Universiteit te Amsterdam.
Hoofd: Dr. J. C. Bodegom.*

overlevingspercentage van vrijwel 100% van subcutaan getransplanteerde kiemen. Weinreb e.a. (1967) daarentegen, constateerden in hun experimenten dat slechts 3% van de getransplanteerde tandkiemen zich verder ontwikkelden.

Klein (1971) verrichtte een systematisch onderzoek naar de immunologische reacties van getransplanteerde tandkiemen. Hij constateerde dat het percentage succesvolle kiemtransplantaties hoger lag dan op grond van ervaringen met transplantaties van weefsels en organen mocht worden verwacht. Uit het histologisch onderzoek kwam naar voren dat zich vrij kort na de transplantatie rondom de kiem een bindweefselkapsel vormt. Klein veronderstelt dat dit kapsel een effectieve barrière vormt die de kiem tegen immunologische aanvallen beschermt. Voorwaarde hierbij is dat