

7. Dallemagne, M. J., Melon, J. (1946): La localisation de l'apatite et du phosphate tricalcique dans l'émail dentaire. Arch Biol 57: 79.
8. Driessens, F. C. M. (1980): The mineral in bone, dentine and tooth enamel. Bull Soc Chim Belge 89: 663.
9. Driessens, F. C. M., Van Dijk, J. W. E., Borggreven, J. M. P. M., Verbeeck, R. M. H. (1980 a): On the physical chemistry of tooth enamel and the caries process. J Biol Buccale 8: 117.
10. Driessens, F. C. M., Van Dijk, J. W. E., Borggreven, J. M. P. M., Verbeeck, R. M. H. (1980 b): Contribution to the physico-chemical rationale for the caries reducing effect of fluoride. J Biol Buccale 8: 239.
11. Driessens, F. C. M., Verbeeck, R. M. H. (1981): Probable phase composition of the mineral in sound enamel and dentine. To be published.
12. Dijk, J. W. E. van, Borggreven, J. M. P. M., Driessens, F. C. M. (1979): Chemical and mathematical simulation of caries. Caries Res 13: 169.
13. Eanes, E. D., Meyer, J. L. (1978): The influence of fluoride on apatite formation from unstable supersaturated solutions at pH 7.4. J Dent Res 57: 617.
14. Featherstone, J. D. B., Duncan, J. F., Cutress, T. W. (1978): Crystallographic changes in human tooth enamel during in vitro caries simulation. Arch Oral Biol 23: 405.
15. Hallsworth, A. S., Robinson, C., Weatherell, J. A. (1971): Chemical pattern of carious attack. J Dent Res 50: 664.
16. Hallsworth, A. S., Robinson, C., Weatherell, J. A. (1972): Mineral and magnesium distribution within the approximal carious lesion of dental enamel. Caries Res 6: 156.
17. Hallsworth, A. S., Weatherell, J. A., Robinson, C. (1973): Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. Caries Res 7: 345.
18. Heifetz, S. B., Mellberg, J. R., Winter, L. J., Doyle, J. (1970): In vivo fluoride uptake by enamel of teeth of human adults from various topical fluoride procedures. Arch Oral Biol 15: 171.
19. Isaac, S., Brudevold, F., Smith, F. A., Gardner, D. E. (1958): Solubility rate and natural fluoride content of surface and subsurface enamel. J Dent Res 37: 254.
20. Klement, R., Trömel, G. (1933): Zusammensetzung und Bildung der anorganischen Knochen und Zahnschubstanz. Klin Wochenschr 12: 292.
21. Little, M. F. (1961): Studies on the inorganic carbondioxyde component of human enamel. J Dent Res 40: 903.
22. Nikiforuk, G., Grainger, R. M. (1965): Fluoride-carbonate-citrate interrelations in enamel. In: M. V. Stack en R. W. Fearnhead (Eds.), Tooth enamel. J. Wright, Bristol P. 26-34.
23. Posner, A. S., Stephenson, S. R. (1953): Isomorphous substitution in enamel apatite. J Am Dent Assoc 46: 257.
24. Pot, T., Groeneveld, A., Purdell-Lewis, D. J. (1977): The origin and behaviour of white spot enamel lesions. Neth Dent J 85 (Suppl.): 6.
25. Roseberry, H. H., Hastings, A. B., Morse, J. K. (1931): X-ray analysis of bone and teeth. J Biol Chem 90: 395.
26. Söremark, R., Grøn, P. (1966): Chloride distribution in human dental enamel as determined by electron probe microanalysis. Arch Oral Biol 11: 861.
27. Tung, M. S., Chow, L. C., Brown, E. M. (1980): Effects of pH on mechanism of F⁻ uptake. IADR Abstracts: 345.
28. Wei, S. H. Y., Schulz, E. M. (1975): In vivo microsampling of enamel fluoride concentrations after topical treatments. Caries Res 9: 50.

April 1981. Adres: Prof. Dr. F. C. M. Driessens, Erasmuslaan 1, 6525 GE Nijmegen.

ANTICARIOGENE EFFECTEN VAN SPEEKSEL

P. A. ROUKEMA

Uit de afdeling Biochemie van de Mondholte van de Vrije Universiteit te Amsterdam.

Inleiding

De tanden en kiezen zijn voortdurend in contact met speeksel, dat geproduceerd wordt door drie paar grote speekselklieren^{*)} en talloze kleine, accessoire kliertjes.

Het speeksel is van groot belang in de preventie van cariës en het herstel van carieuze lesies. Dit komt vooral naar voren in die situaties, waar de speekselstroom sterk is verminderd, zoals na bestraling van de klieren of na hun verwijdering. Een snelle toename van cariës wordt dan geconstateerd, ook lokaal als slechts één klier wordt verwijderd (Dreizen c.s., 1977). Dit effect neemt men vooral waar als de speekselproductie vrijwel geheel stilstaat. In het algemeen kan de speekselvloed echter tussen wijde grenzen variëren zonder dat een merkbaar effect op de gebitselementen wordt waargenomen. Een correlatie tussen de speekselvloed en de cariësfrequentie is dan ook alleen aantoonbaar in extreme omstandigheden. Ook variatie in

Samenvatting:

Hoe belangrijk het speeksel dat voortdurend de tanden omspoelt is voor de bescherming tegen cariës en voor het herstel van lesies blijkt als – door bestraling of na verwijdering van de klieren – de speekselvloed drastisch wordt vermindert.

Speeksel draagt door de organische bestanddelen op verscheidene wijzen bij aan de bescherming van de tanden:

1. Door de vorming van een dun eiwitlaagje, de pellicel, op het tandoppervlak. Proline-rijke eiwitten en (sial)zuur en sulfaat bevattende mucines vormen in hoofdzaak de pellicel die de demineralisatie van glazuur door zuur remt. Daarnaast bevat speeksel fosfaat-houdende eiwitten (statherine en PRP_{III}) die in geringe concentratie het neerslaan van in speeksel oververzadigd hydroxyapatiet kunnen voorkomen.
2. Het speeksel beschermt de tanden ook door zijn vermogen met immunoglobulines en mucines bacteriën te agglutineren en zo hun aanhechting aan het tandoppervlak te verhinderen.
3. De speekselenzymen lysozyme, lactoperoxydase en lactoferrine grijpen op de stofwisseling van bacteriën in en belemmeren hun groei.

Het gewicht van de verschillende factoren varieert met de hoeveelheid en de zuurgraad van het geproduceerde speeksel en met de tijd van de dag.

speekselsamenstelling, b.v. van calcium en fosfaat, geeft geen direct verband te zien met de mate waarin cariës optreedt (Mandel, 1974).

*) Afkortingen: gl. parotis: Par, gl. submandibularis: SM en gl. sublingualis: SL.

De laatste jaren is duidelijk geworden dat er vele factoren in speeksel zijn, die bijdragen tot de integriteit van het gebit. De meeste aandacht is hierbij gericht geweest op de rol van calcium, fosfaat en fluoride in het speeksel en het beschermende effect van speeksel op de inwerking van zuren is door velen nagegaan. Een belangrijk aspect in het onderzoek was hierbij de remineralisatie van glazuur in contact met speeksel (Grön, 1973).

Recentelijk is echter steeds meer naar voren gebracht, dat niet alleen de anorganische bestanddelen maar ook de organische componenten een belangrijke bijdrage leveren aan de bescherming van het gebit. Hierbij wordt met name gedacht aan de eiwitten, die betrokken zijn bij de vorming van de 'acquired pellicle' en de eiwitten die de hechting en aggregatie van bacteriën beïnvloeden. Daarnaast zijn er de eiwitten met antibacteriële activiteit, zoals lysozym, lactoferrine en lactoperoxydase.

Pellikel en plaque

De aanwezigheid van plaque is een noodzakelijke voorwaarde voor het optreden van cariës en parodontopathieën. Voorafgaande aan de plaquevorming heeft echter de afzetting plaats van een eiwitlaag op het glazuur, de 'acquired pellicle', welke bepalend is voor de hechting van de bacteriën. De dikte van de pellicel kan oplopen tot 10 μ m en de vorming begint op schoongemaakt glazuur (b.v. met puimsteen) vrijwel momentaan. Na de pellicelvorming wordt de initiële plaque gevormd. Na 1 uur bezetten de bacteriën \pm 1% van het glazuuroppervlak. Aggregaten worden gevormd, die geleidelijk in omvang toenemen. Na enkele dagen is een continue, dikke bacterielaag aanwezig waarvan de groei beperkt wordt door de schurende werking in de mond. Bij de hechting zijn enerzijds extracellulaire dextranen betrokken, anderzijds speeksel-eiwitten. (Gibbons en Spinell, 1970). Experimenten van Orstavik (1974) wijzen erop dat speeksel ook eiwitten bevat die hechting van bacteriën tegen gaan door aggregatie van bacteriën

Tabel I. Overzicht van kwantitatief en functioneel belangrijke eiwitten in speeksel.

	pI	Mol. Gew. ($\times 10^{-3}$)	Koolhydr. (%)	Par	SM	Totaal	
						PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
(mg/100 ml)							
Amylase	6-7	54-57	≤ 5	40-45	30	40	
Prolinerijke eiwitten							
- zure	± 4.4	6-12	+	± 50	± 50	± 50	+
- basische	9.5	35	40	± 50	± 50	± 50	
Mucinen	2-2.5	≤ 500	70-90	—	20*)	$\pm 50^{**}$	+
Immunoglobulinen							
- IgA						19.4***)	
- IgG						1.4	
- IgM						0.2	
Lactoferrine						0.5-2.0	
Lactoperoxydase						± 1	
Lysozym	10.5	14	—	2.3	1.5	2	

*) De SL en de accessoire klieren produceren vergelijkbare hoeveelheden.

**) Inclusief SL en de accessoire klieren.

***) Inclusief secretie IgA.

Totale productie: \pm 200 mg eiwit/100 ml speeksel.

in het speeksel. Deze aggregaten remmen juist de hechting aan het glazuur/pellikeloppervlak en beperken daarvoor de groei van de plaque.

Welke eiwitten in speeksel de diverse effecten veroorzaken is het thema geweest van veel onderzoek in de laatste jaren en we willen dan ook achtereenvolgens nagaan:

1. welke eiwitten betrokken zijn bij de vorming van de 'acquired pellicle';
2. welke speeksel-eiwitten aggregatie/agglutinatatie van bacteriën geven en hoe deze de hechting aan het glazuur en de pellicel beïnvloeden en
3. welke antibacteriële activiteit lysozym, lactoferrine en lactoperoxydase bezitten.

Eiwitten, betrokken bij de vorming van de 'acquired pellicle'

Bernardi c.s. (1972) onderzochten de hechting van eiwitten aan synthetisch hydroxyapatiet en constateerden hierbij dat zure groepen essentieel zijn voor de hechting. In overeenstemming hiermee is dat eiwitten, die bij fysiologische pH negatief geladen zijn, relatief sterk gebonden worden. Tot deze eiwitten behoren onder meer de prolinerijke eiwitten uit de Par en de SM. (zie tabel I). Ze bezitten een zeer karakteristieke aminozuursamenstelling. Proline, glutaminezuur en glycine

maken samen 70-80% van het totaal uit. Daarnaast bevatten ze vaak fosfaat, gebonden aan serine. De hoeveelheid van deze laatste, de zgn. zure prolinerijke eiwitten bedraagt in totaal speeksel 50 ± 26 mg/100 ml.

Samen met de basische prolinerijke eiwitten vormen ze ongeveer $\frac{2}{3}$ van alle eiwitten in speeksel. Het belang van deze eiwitten blijkt uit de relatief hoge bijdrage aan de 'acquired pellicle', nl. ruim 40% en de binding van calcium: in gestimuleerd speeksel tot 38% (Benick, 1978). Andere eiwitten, die ook in hoge concentratie in speeksel aanwezig zijn, zoals amylase en lysozym, komen relatief weinig voor in de pellicel (Orstavik c.s., 1974).

Twee van de prolinerijke eiwitten, de fosfoproteïnen statherine en het zogenaamde PRP_{III}, verdienen speciaal vermelding, omdat ze de precipitatie van oververzadigd hydroxyapatiet in speeksel tegengaan. Dit effect wordt reeds bereikt bij zeer lage concentraties ($\pm 1.10^{-6}$ M) en berust waarschijnlijk op het afschermend effect van gevormde kristallisekernen. Anderzijds kan door een zelfde effect ook de snelheid van demineralisatie geremd worden.

Naast de prolinerijke eiwitten hechten zich ook de hoogmoleculaire glycoproteïnen, geproduceerd door de submandibulaire, sublinguale en acces-

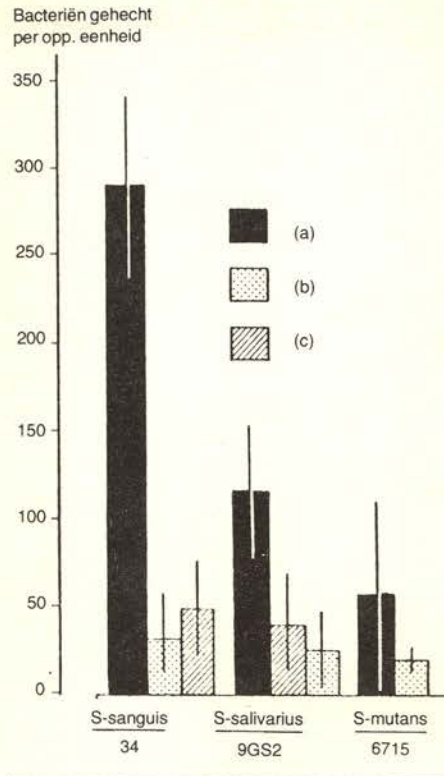
soire klieren (mucinen, bloedgroep-substanties) relatief sterk aan glazuur. De negatief geladen groepen in deze eiwitten zijn de carboxylgroepen van de suiker siaalzuur en sulfaat. Ook *in vitro* is aangetoond, dat bij voorkeur prolinerijke eiwitten (Hay c.s., 1973) en hoogmoleculaire glycoproteïnen (McGaughey c.s., 1971; Hay c.s., 1971 en Roukema c.s., 1976) gebonden worden. Voor de laatste is de hoeveelheid die gebonden wordt, sterk afhankelijk van de pH, van pH 5 à 6 tot 7 à 8 neemt hij sterk af. De hoeveelheid van de mucinen is in dezelfde orde van grootte als die van de zure prolinerijke eiwitten (tabel I). Samen met de prolinerijke eiwitten vormen ze het grootste deel van de eiwitten in de pellicel.

Het belang van de 'acquired pellicle' en speekseiwitten voor de hechting en aggregatie van de bacteriën.

De pellicel beschermt het glazuropervlak tegen de inwerking van zuren, gevormd door bacteriecultures (b.v. van *S. mutans*) en remt het effect van zure buffers af (Zahradnik c.s., 1977). Daarnaast is er een belangrijk effect op de hechting van bacteriën met name in de initiële fase. Als voorbeeld zal een experiment van Orstavik c.s. (1974) beschreven worden. Ze onderzochten de interactie van *S. sanguis*, *S. salivarius* en *S. mutans* met glazuur. In de afwezigheid van een eiwitpellicel werd na 1 uur weinig adsorptie gevonden (afb. 1). Bovendien was de specificiteit gering. Nadat op het glazuur met speekseiwitten een laagje was gevormd bleken echter grote verschillen op te treden in de hechting en werd met name *S. sanguis* sterk geadsorbeerd. Indien de bacteriën echter werden gepreïncubeerd met speeksel trad weer een sterke reductie in de hechting op.

Uit microscopisch onderzoek bleek dat dit het gevolg was van de aggregatie onder invloed van speekseiwitten.

De speekseiwitten, die deze aggregatie veroorzaken, komen zowel in Par- als in SM/SL-speeksel voor (Gibbons en Spinell, 1970; Ericson c.s.,



Afb. 1. Hechting van verschillende soorten streptococci aan glazuur.

- Aan glazuur, voorzien van een laagje speekselwit.
- Aan glazuur zonder zo'n laagje.
- Als a., maar na pre-incubatie van de bacteriën met speeksel.

1979, Hay c.s., 1971). Het zijn enerzijds de immunoglobulinen, zoals IgA, die interfereren met de hechting van bacteriën, anderzijds de mucinen.

Zolang de bacteriën zich nog niet gehecht hebben aan de glazuurpellicel, kunnen deze macromoleculen leiden tot specifieke aggregatie van bacteriën in het speeksel. De aanwezigheid van Ca^{2+} -ionen ($\pm 10^{-4}$ M) is daarbij vereist.

Voor de aggregatie van een bepaald type micro-organisme is bovendien gebleken, dat het benodigde eiwit zeer specifiek is. Gibbons en Spinell (1970) toonden dit aan, door eerst *S. sanguis* te laten reageren met speeksel. Nadat de aggregerende componenten voor deze bacterie waren verdwenen bleven de factoren voor aggregatie van *S. mitis* over. Uit nadere onderzoekingen (Ericson c.s., 1979) bleek verder, dat de aggregatie ook serospecifiek is. Zo verhinderde reactie van parotisspeeksel met *S. mutans* serotype C verdere reactie met dit serotype, maar

niet met *S. mutans* type a, b, d en c. De betrokkenheid van de immunoglobulinen bij deze aggregatie kon worden aangetoond (Ericson c.s., 1979) door antisera te bereiden tegen IgA, IgM en IgG. Deze remden de aggregatie van micro-organismen, geïnduceerd door speeksel.

Van praktisch belang is de waarneming, dat de plaquevorming daalt bij een toename van de hoeveelheid aggregerende factoren in speeksel. Parallel hieraan werd ook minder cariës geregistreerd (Ericson c.s., 1979)

De speekseiwitten beschermen het gebit tegen cariës dus op de volgende manieren:

- door de vorming van een 'acquired pellicle', die een barrière vormt tegen de aantasting door zuren;
- door de interactie met bacteriën en dientengevolge aggregatie, wat een limiterende werking heeft op de hechting van bacteriën en de vorming van plaque, m.n. in de initiële fase.

Antibacteriële activiteit van speeksel

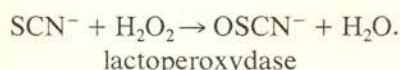
Een antibacteriële activiteit van speeksel is toe te schrijven aan een aantal andere eiwitten, dan de tot nu toe genoemde, nl. lysozym, het lactoperoxydase en het lactoferrine.

Lysozym is afkomstig van de Par, de SM, de SL, de crevulaire vloeistof en de leucocyten. De hoeveelheid lysozym in speeksel bedraagt $\pm 20-40$ mg/dag; de polymorfonucleaire leucocyten dragen ± 1 mg/dag bij. De werking berust op een lysering van de bacteriële celwand, waarbij $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glycosidische bindingen verbroken worden tussen N-acetylglucosamine en N-acetylmuraminezuur. Hierdoor worden de voor lysozym gevoelige stammen in de mondholte geëlimineerd en wordt kolonisatie voorkomen.

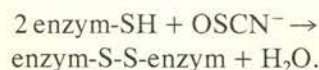
Lactoperoxydase (± 1 mg/100 ml speeksel) is een enzym, dat geproduceerd wordt door de acinaire cellen van de Par en de SM. In combinatie met het isothiocyanaat (SCNH) uit speeksel en waterstofperoxyde ge-

vormd door bacteriën, wordt een effectieve remming van de stofwisseling en groei van bacteriën verkregen. Dit werd in het verleden aangetoond voor lactobacilli en meer recent voor andere bacteriën, zoals *E. coli*, *S. aureus* en *S. mutans*.

Een essentiële rol in het systeem heeft het isothiocyanaat (SCNH), dat onder invloed van het enzym lactoperoxydase door H_2O_2 geoxydeerd wordt tot hypothioxyanaat:



Het hypothioxyanaat ($OSCN^-$) kan de bacteriecel binnendringen en remt daar de glycolyse. Dit berust op de oxydatie van sulfhydryl (-SH)-groepen in de eiwitketen van glycolytische enzymen (b.v. hexokinase):



Dit is vooral van belang bij een overmatig aanbod van substraat (suikers). In dat geval zal de glycolyse op zo'n hoog niveau gaan verlopen, dat meer melkzuur wordt gevormd, dan de bacteriecel voor zijn eigen stofwisseling nodig heeft. Buiten de cel zal dit melkzuur dan bijdragen tot het optreden van cariës.

Door het lactoperoxydase-isothiocyanaat- H_2O_2 -systeem kan de glycolytische activiteit van de cel en daarmee de produktie van melkzuur in bedwang worden gehouden.

Lactoferrine is een ijzerhoudend eiwit. De hoeveelheid in speeksel bedraagt 0.5-2.0 mg/100 ml. Het komt

niet alleen voor in melk, zoals de naam aangeeft, maar ook in speeksel en andere lichaamsvloeistoffen en in de polynucleaire leucocyten. In de Par en SM wordt het geproduceerd door de acinaire cellen. De sterke ijzerbinding van het lactoferrine voorkomt, dat bacteriën, die ijzer (III) nodig hebben voor hun groei, dit kunnen opnemen. Dit is b.v. aangetoond voor *Candida albicans* en *E. coli*.

Summary:

Title: Anticariogenic effects of saliva.

The teeth are continuously bathed in saliva and as such saliva is of utmost importance in the protection from caries and the repair of caries lesions. This is especially clear from situations where the salivary flow is strongly diminished, e.g. after irradiation of the glands or their removal.

Saliva contributes to the protection of the teeth in several ways.

I. By coating the surface with a thin layer of proteins, the acquired pellicle. This layer is rich in proline-rich proteins, derived from the parotid and submandibular glands. The acidic, phosphate containing proline-rich proteins contribute about 40% to the total protein in the pellicle. The sialic acid and sulfate containing mucins, produced by the mucus gland cells have also been detected in relatively high amounts in the acquired pellicle. The pellicle reduces the velocity of demineralization of enamel by acids and by cultures of bacteria, producing those acids. On the other hand, saliva is supersaturated with respect to hydroxyapatite and nearly saturated with respect to decalciumphosphate dihydrate. Two phosphoproteins in parotid and submandibular saliva, namely statherin and PRD_{III} stabilize this situation at very low concentrations ($\pm 10^{-6}M$).

II. Protection from the environment is obtained by bacterial agglutination and removal of the bacteria by specific proteins. The immunoglobulins react with bacteria forming antigen-antibody complexes, in this way reducing affinity to

the hydroxyapatite surface. This reaction is species- and sero-specific. Mucins, which are present in saliva in comparable quantities as the immunoglobulines lead to similar reactions. Due to aggregation adherence is inhibited.

III. Metabolic effects on the bacterial flora and inhibition of growth provide a second line of defense against bacterial attack. To this system the salivary enzymes lactoperoxidase and lysozyme and the iron-binding protein lactoferrin contribute. The relative effects of the various factors in the protection of the teeth against caries are dependent on the salivary flow, the pH and the time of day.

Literatuur:

1. Bennick, A., Cannon, M. (1978): Caries Res 12: 159.
2. Bernardi, G., Giro, M. G., Gaillard, C. (1972): Biochim Biophys Acta 278: 409.
3. Dreizen, S., Brown, L. R., Dale, T. E., Drane, J. B. (1977): J Dent Res 56: 99.
4. Ericson, T. H., Bratthall, D., Rudegren, J. (1979): In: Saliva and dental caries, Information Retrieval, Washington. P. 243.
5. Gibbons, R. J., Spinell, D. M. (1970): In: McHugh, Dental plaque, Livingstone, Edinburgh. P. 207.
6. Grön, P. (1973): Oral sciences reviews III: 84.
7. Hay, D. J., Gibbons, R. J., Spinell, D. M. (1971): Caries Res 5: 111.
8. Hay, D. J. (1973): Archs Oral Biol 18: 1517.
9. Mandel, I. D. (1974): J Dent Res 53: 246.
10. McGaughey, C., Field, B. D., Stowell, E. C. (1971): J Dent Res 50: 917.
11. Orstavik, D., Kraus, F. W., Henshaw, L. C. (1974): Infection and immunity 9: 794.
12. Roukema, P. A., Oederkerk, C. H., Van Nieuw Amerongen, A. (1976): Abstracts IADR-congres P. 13.
13. Zahradnik, R. T., Moreno, E. C., Burke, E. J. (1976 en 1977): J Dent Res 55: 664 en 56: 1107.

April 1981. Adres: Prof. Dr. P. A. Roukema, De Boelelaan 1115, 1081 HV Amsterdam.

Boekbesprekingen

E. Krüger en P. Worthington: *Oral surgery in dental practice*. 392 pag., 200 afb. Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin, Chigaco, Tokyo 1981. Prijs \$ 68,—.

Het boek 'Oral Surgery in Dental Practice' is een zeer fraai uitgegeven boek, geschre-

ven voor tandartsen met belangstelling voor dento-alveolaire chirurgie.

Een zeer positief punt van het boek is, dat het geschreven is door een Duitse én een Amerikaanse auteur. Hierdoor worden de verschillende opvattingen, die in de Amerikaanse en Europese literatuur op dit gebied bestaan, geïntegreerd. Gesteld kan

worden, dat 'the best of both worlds' wordt geboden.

Het boek is hoofdzakelijk gericht op de algemeen-tandheelkundige praktijk, geeft echter voldoende achtergrondinformatie en tevens, na elk hoofdstuk, een kort lijstje met aanbevolen literatuur.

Een algemene inleiding wordt gevolgd door hoofdstukken over lokale- en algehe-