

DE INVLOED VAN KLASSE II-AMALGAAMRESTAURATIES OP HET VERLIES VAN PARODONTALE AANHECHTING

SAMENVATTING

DR. G. KESZTHELY

Trefwoorden: Parodontologie – Restauratieve tandheelkunde – Amalgaamrestauratie – Aanhechting

Bij 176 geëxtraheerde elementen met klasse II-amalgaamrestauraties werd een onderzoek ingesteld naar het verlies van parodontale aanhechting. Het materiaal was gelijkmatig verdeeld wat betreft soort element, kaak van herkomst en het beoordeelde proximale vlak.

De elementen werden gekleurd en het verlies aan parodontale aanhechting werd gemeten onder de stereomicroscop voor-

zien van een oculair met micrometer. De cervicale randen van de restauraties werden beoordeeld met een sonde.

Vastgesteld kon worden dat slechts 14,2% der restauraties een goede marginale aansluiting vertoonde. Het verlies van aanhechting op de gerestaureerde vlakken bleek met 1,37 mm significant groter ($P < 0,001$) dan op de niet behandelde, klinisch gezonde vlakken van dezelfde ele-

menten (0,87 mm).

Tussen mesiaal en distaal kon vrijwel geen verschil in aanhechting worden gevonden, noch op behandelde, noch op onbehandelde vlakken. De gerestaureerde vlakken en ondermolaren toonden minder verlies van aanhechting in vergelijking met dezelfde vlakken van de bovenmolaren en de onderpremolaren, hetgeen in beide gevallen een geringe significantie vertoonde ($P < 0,05$).

Het waargenomen verschil van 0,50 mm tussen gerestaureerde en gave vlakken komt overeen met meer dan 50% toename in verlies aan parodontale aanhechting. Ondanks deze statistische significantie moet echter worden beklemtoond dat deze bevindingen in dit stadium van parodontitis niet van klinisch belang zijn.

April 1983.

VERWANTSCHAP VAN OSTEOCLASTEN EN MACROFAGEN – IMPLICATIES VOOR HET MECHANISME VAN BOTVERLIES BIJ PARODONTALE AANDOENINGEN

E. H. BURGER

*Uit de afdeling Orale Celbiologie
van de Vrije Universiteit te Amsterdam.*

Trefwoorden: Parodontologie – Botverlies – Herkomst osteoclasten

Inleiding

Over de herkomst van de osteoclast, de veelkernige reuscel die verantwoordelijk is voor de afbraak van bot, dentine, cement en verkalkt kraakbeen, is de laatste tien jaren veel onderzoek gepubliceerd en misschien nog wel meer gespeculeerd. De vraag waar het om ging was of de osteoclast, net als de botvormende cel of osteoblast en de kraakbeencel of chondrocyt, uit het mesenchym van de botaanleg zelf ontstond, mogelijk zelfs door fusie van osteoblasten die daarna dus hun eigen produkt weer zouden afbreken, of dat ze van heel andere oorsprong waren waarbij gedacht werd aan bloedcellen. De laatste jaren is de schaal echter definitief doorgeslagen naar de laatste opvatting. Met behulp van ingenieuze experimenten aan bestraalde en mutante proefdieren is namelijk aangetoond dat osteoclasten afkomstig zijn uit het beenmerg, en in de vorm van éénkernige precursorcellen via de bloedbaan naar andere plaatsen in het lichaam getransporteerd kunnen worden.^{1,2} De bloedcel die het meest in aanmerking leek te komen voor deze rol van mononucleaire clast-precursor was de monocyt en wel om een aantal redenen: a. van monocyten was aangetoond dat ze de bloedbaan verlaten en in het bindweefsel in de gedaante van macro-

fagen een belangrijke rol vervullen bij het opruimen van zowel lichaamsvreemde als lichaamseigen elementen, zoals binnengedrongen micro-organismen en afgestorven rode bloedcellen,³ b) macrofagen zijn, net als osteoclasten, bewegelijke cellen met een grillig oppervlak, en c) macrofagen kunnen fuseren tot zogenaamde vreemdlichaam-reuscellen, reusachtige cellen met soms wel meer dan honderd kernen, die gevormd worden als reactie op een te groot of te moeilijk afbreekbaar 'obstakel'. Licht- en elektronenmicroscopisch bekeken verschillen deze vreemdlichaam-reuscellen echter duidelijk van osteoclasten, met name wat betreft de ligging van de kernen en de aantallen mitochondria.

In het recente verleden zijn er dan ook door verschillende onderzoekers pogingen gedaan om macrofagen in vitro, dus in weefselkweek, osteoclasten te laten vormen, echter zonder het beoogde resultaat: macrofagen blijken wel in staat om fijn gemalen botmineraal verder af te breken, maar ze vormen daarbij geen osteoclasten.⁴ Aan de andere kant kennen we in de menselijke pathologie een tweetal situaties waarbij lokale afbraak van harde weefsels gepaard gaat met de aanwezigheid van veel macrofagen in de buurt van het bot als gevolg van een chronische ontsteking: de reumatoïde arthritis, en de parodontale aandoeningen,

Samenvatting:

Lokale afbraak van bot, cement en dentine wordt bewerkstelligd door osteoclasten, cellen die in vorm en functie enigszins doen denken aan macrofagen. Macrofagen ontstaan uit monocyten van het perifere bloed die zelf afkomstig zijn uit het beenmerg.

In dit artikel worden experimenten besproken die hebben duidelijk gemaakt dat macrofagen en osteoclasten verwant zijn via een gemeenschappelijke voorlopercel in het beenmerg, maar dat eenmaal gevormde weefselmacrofagen niet (meer) in osteoclasten kunnen veranderen.

hoezeer deze twee ook verschillen in etiologie en pathologie.

Chronische parodontitis wordt o.a. gekenmerkt door een dicht ontstekingsinfiltraat in de aangedane pocket, dat bestaat uit lymfocyten, plasmacellen en macrofagen, met wisselende aantallen neutrofiële granulocyten.⁵ Naast verlies van bindweefsel-aanhechting is er een cyclische en variabele osteoclastische afbraak van het alveolaire bot en het cement en de dentine van de tandwortel. Deze lokale afbraak betekent een lokale versterking van het evenwicht van botaanmaak en botafbraak en hij is daarmee van geheel andere aard dan de gegeneraliseerde botafbraak die we vinden bij een metabole botziekte als hyperparathyroidie.

De mogelijkheid, dat bij parodontale aandoeningen cellen uit het infiltraat van de ontstoken pocket wel eens direct een sturende invloed op het proces van mineraal-

verlies zouden kunnen uitoefenen, heeft met name in de Verenigde Staten tot een hausse geleid in onderzoek op het gebied van ontsteking en botombouw.

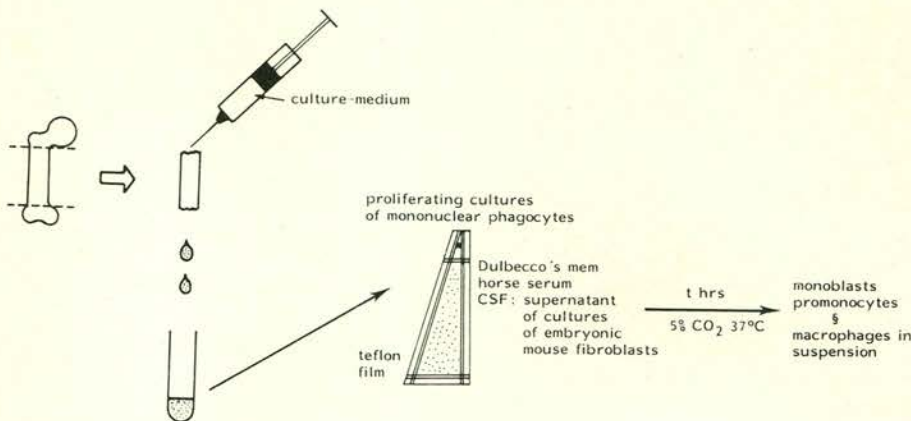
Experimenten

In de afgelopen jaar is door Van der Meer, Van Furth, Thesingh en mijzelf onderzoek verricht over het vraagstuk van de verwantschap van osteoclasten en macrofagen, met het gebruik maken van in vitro methoden. Door een gelukkige combinatie van expertise van twee onderzoeksgroepen, de afdeling Infectieziekten van het Academisch Ziekenhuis te Leiden en de afdeling Celbiologie en Histologie van de rijksuniversiteit te Leiden, en sinds een jaar, de afdeling Orale Celbiologie van de Vrije Universiteit, zijn wij er daarbij in geslaagd om een bewijs te vinden voor de gemeenschappelijke oorsprong van macrofagen en osteoclasten.⁶ Voor ons onderzoek werden twee weefselkweektechnieken met elkaar gecombineerd: ten eerste, de kweek van macrofagen en hun precursors uit het beenmerg van de muis en ten tweede de kweek van groeiende pijpbeentjes uit het embryo van de muis.

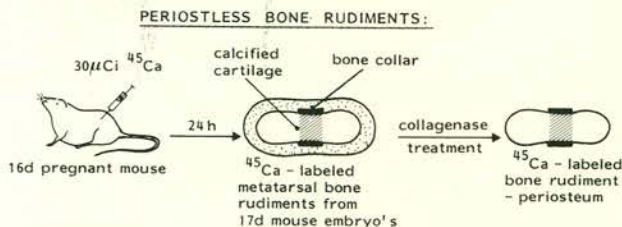
Direct na isolatie bevat een suspensie van beenmergcellen van de volwassen muis grote aantallen ongedifferentieerde blastcellen van zowel de erythroïde lijn, de granulocyttaire lijn, de lymfoïde lijn als de monocyt-macrofagen lijn. Door nu dit materiaal 1 à 2 weken te kweken in aanwezigheid van een selectief stimulerende stof kan men hieruit een 'reincultuur' van macrofagen en hun voorlopers verkrijgen. De specifiek stimulerende stof is aanwezig in kweekmedium waarin embryonale muizefibroblasten zijn gegroeid, maar hij kan ook geïsoleerd worden uit serum of urine.⁷ In ons geval is gebruik gemaakt van het supernatant van fibroblastenkweken. Na zeven dagen kweek in aanwezigheid van supernatant, dat 'Colony Stimulating Factor' (CSF) bevat, bestaat de beenmergkweek voor 70 à 80% uit macrofagen en hun voorlopers en voor de rest uit (voorlopers van) neutrofiële granulocyten. Na 14 dagen zijn ook de granulocyten verdwenen terwijl het aantal macrofagen en hun progenitors nog steeds toe neemt (zie afb. 1).⁸

Deze 'reincultuur' werd vervolgens gedurende een week samengekweekt met een snelgroeiend embryonaal muizepompbeentje dat tevoren was ontdaan van zijn endogene populatie osteoclasten en osteoclasten-precursorcellen.

Dit laatste ging als volgt: In het 17-daagse muizeembryo, dus 3 à 4 dagen voor de geboorte, vinden we in de voet een aantal middenvoetsbeentjes die nog niet geïnvadeerd zijn door osteoclasten. Deze bevinden zich met hun precursors nog alle in het periost buiten het pijpbeen zelf. Door dit periost enzymatisch met collagenase te verwijderen houdt men een kaal massief



Afb. 1. Schematische weergave van de kweek van macrofagen en hun voorstadia, de monoblasten en de promonocyten, uit volwassen beenmerg van het femur van de muis.



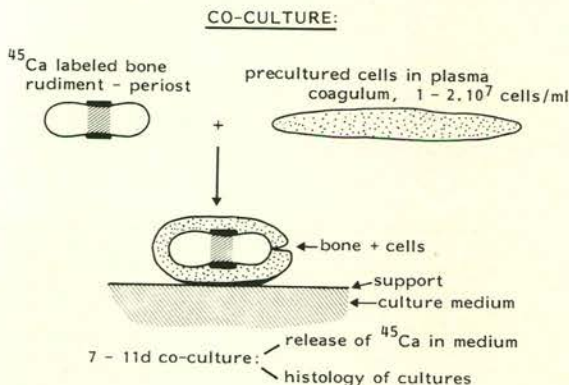
Afb. 2. Schema van de isolatie van met ⁴⁵Ca gemerkte, periostloze pijpbeentjes van muizeembryo's.

pijpbeentje over dat hoofdzakelijk bestaat uit verkalkt diafysair kraakbeen omgeven door een dunne botkoker met aan weerszijden een onverkalkte epifyse (zie afb. 2). Door hun geringe afmeting (lengte 1,5 mm) laten deze botjes zich in hun geheel kweken als een orgaantje, waarbij de botgroei doorgaat maar waarbij geen osteoclasten worden gevormd mits het periost volledig is verwijderd. Afbraak van verkalkte matrix treedt ook niet op, wat te volgen is door het mineraal voor de aanvang van de proef te merken met radioactief calcium: inspuiten van de zwangere moedermuis met ⁴⁵Ca veroorzaakt 'labeling' van de snelgroeiende beenderen van de embryo's (zie afb. 2). Door het kweekmedium na afloop van de proef te analyseren op radioactief calcium kan men te weten komen of er botresorptie heeft plaatsgevonden of niet. Bovendien kan men het gekweekte pijpbeen na afloop van de proef histologisch bewerken om te

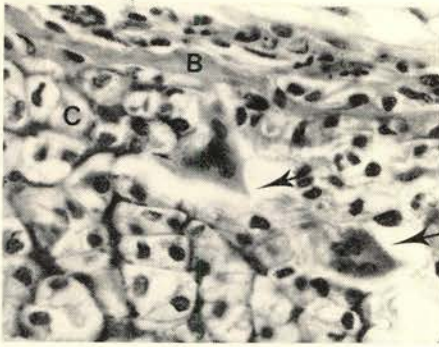
zien of er tijdens de kweek osteoclasten zijn ontstaan.

Bij onze co-culture experimenten werd voorgekweekt beenmerg, dat alleen nog macrofagen en macrofaag-progenitors bevatte, samengekweekt met periostloze pijpbeentjes, en wel zo dat de beenmergcellen in nauw contact kwamen met het bot. Daartoe werden de cellen opgenomen in plasma dat tot stollen werd gebracht, waarna het stolsel met cellen om het pijpbeen werd gewikkeld (zie afb. 3). Afbeelding 4 toont het resultaat van zo'n co-culture experiment: multinucleaire osteoclasten, waarvan er twee in de figuur zijn aan te treffen, zijn het pijpbeen binnengedrongen en hebben de verkalkte matrix geresorbeerd.

Niet alleen volwassen beenmerg was in staat om osteoclasten te vormen, ook embryonaal bloedvormend weefsel, dat voordat het beenmerg is aangelegd wordt aan-



Afb. 3. Schema van een co-culture experiment. Periostloze pijpbeentjes worden samengekweekt met beenmergcellen die zijn opgenomen in een plasmastolsel. Ook andere celpopulaties kunnen zo met een pijpbeen worden samengekweekt.



Afb. 4. Histologisch detailbeeld van een periostloos pijpbeentje dat was samengekweekt met beenmergcellen. Twee multinucleaire osteoclasten (pijltjes) zijn het pijpbeen binnengedrongen en hebben de verkalkte matrix geïrodeerd. B = botkoker, C = chondrocyten. × 600.

getroffen in de lever van het embryo, leverde in vitro veel osteoclasten. De embryonale osteoclasten zagen er net zo uit als die van het volwassen beenmerg.

Al met al was dit een zeer duidelijke aanwijzing dat de osteoclast inderdaad behoort tot het systeem van Mononucleaire Fagocyten of MPS, zoals de grote familie van monocyten en hun differentiatievormen in de weefsels (b.v. bindweefselmacrofagen, alveolaire macrofagen in de longen en Kupffercellen in de lever) worden genoemd.

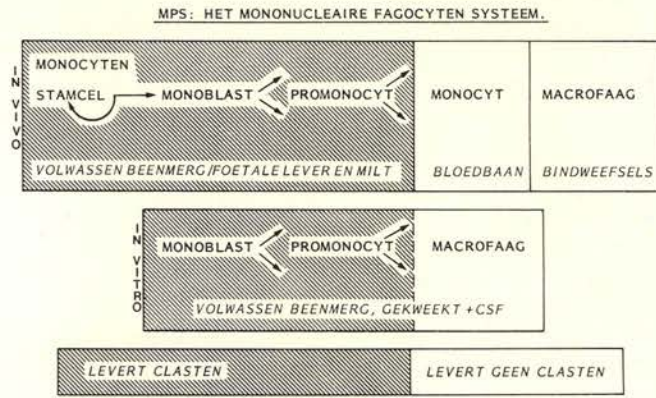
Het lag dan ook voor de hand om de monocyten zelf en vervolgens populaties macrofagen uit het bindweefsel te onderzoeken op hun vermogen tot het vormen van osteoclasten. Behalve bloedmonocyten, die door centrifugatie over een Ficoll-hypaque laag werden geïsoleerd, gebruikten we macrofagen uit de buikholte van de muis.

Deze laatste populatie is eenvoudig te verkrijgen door de buikholte van de gedode muis te wassen met een isotone vloeistof. Bovendien kan men een massale influx van monocyten in de buikholte opwekken door het proefdier enige dagen te voren intraperitoneaal in te spuiten met een lichaamsvreemde stof als kalverserum of thioglycolaat.

Geen van de populaties monocyten of buikholte-macrofagen die wij onderzochten bleek echter in staat om in het co-cultu-

Tabel I. Samenvatting van de co-culture experimenten met verschillende populaties cellen.

Periostloze pijpbeentjes, samengekweekt met:	Clasten gevormd tijdens kweekperiode
Geen andere cellen	-
Foetale lever	+
Gekweekt volwassen beenmerg	+
Idem, na bestraling	-
Idem, alleen zwak adherente cellen	+
Idem, alleen sterk adherente cellen	-
Bloedmonocyten	-
Weefselmacrofagen	-



Afb. 5. Schema van het Mononucleaire Fagocyten Systeem in vivo en in vitro. Alleen de zich delende voorlopercellen zijn in vitro in staat om tot osteoclasten te differentiëren.

re-systeem met de periostloze pijpbeentjes in 7 dagen osteoclasten te vormen of mineraal af te breken (zie tabel I). Dat was een streep door de rekening en betekende dat we onze gegevens opnieuw moesten interpreteren. Aan de andere kant klopte het wel met de resultaten van andere onderzoekers wie het immers ook niet gelukt was om osteoclasten uit macrofagen te doen ontstaan. Kennelijk lag de zaak ingewikkelder dan een rechtstreekse differentiatie van bloedmonocyt via bindweefselmacrofaag tot osteoclast in het bot.

We zijn dan ook teruggekeerd tot het gekweekte beenmerg, en hebben op twee manieren getracht in deze populatie de jonge, ongedifferentieerde, delende blastcellen te scheiden van de oudere, post-mitotische, uitgerijpte macrofagen.

Beide typen zijn in de culture aanwezig, maar de uitgerijpte cellen hebben het vermogen om zich sterk aan de wand van een plastic petrischaaltje te hechten, terwijl de blastcellen dat nog niet doen, en bovendien door hun delingsactiviteit zeer gevoelig zijn voor bestraling met röntgenstralen. Bestralen van de beenmergkweek betekende dan ook dat de delende cellen na enige dagen volledig uit de populatie verdwenen waren, terwijl onbestraalde controleculturen nog wel blastcellen bevatten. Daarnaast kan men de zwak hechtende blastcellen uit een populatie isoleren door ze met een pipet samen met het medium uit het bakje op te zuigen, waarbij de sterk

hechtende rijpere cellen in het bakje achterblijven.

En nu kwamen we tot een belangrijke ontdekking: zowel na scheiding op hechtvermogen als na scheiding op stralingsgevoeligheid bleek alleen de onrijpe blastpopulatie in staat tot het vormen van osteoclasten. De rijpe, hechtende, stralingsongevoelige cellen, vergelijkbaar met de monocyten, respectievelijk macrofagen uit bloed en bindweefsels, vormden geen clasten, de onrijpe, niet of zwak hechtende, stralingsgevoelige cellen wel (zie tabel I en afb. 5).

Conclusie

Onze conclusie uit deze experimenten is dat alleen voorlopercellen van monocyten en macrofagen in staat zijn om in contact met bot te differentiëren tot osteoclasten. In vivo bevinden deze cellen zich, althans na de geboorte, altijd dicht in de buurt van bot, omdat beenmerg nu eenmaal omgeven wordt door bot. Dit zou een verklaring vormen voor het feit dat er zich in de perifere circulatie geen osteoclasten-voorlopercellen bevinden, of althans zo weinig dat ze met ons co-culture systeem niet aange-toond werden.

Aan de andere kant is het niet onmogelijk dat er zich in het geval van een langdurige ontstekings situatie cellen in het bindweefselinfiltraat verzamelen die in contact met bot en andere harde weefsels zich kunnen ontwikkelen tot osteoclasten. Dit zou een nieuwe populatie osteoclasten bekenen, die lokaal de balans tussen aanmaak en afbraak van harde weefsels zou verstoren met als resultaat verlies van bot, cement en dentine. Deze ontstekings situatie is in zoverre verschillend van onze omstandigheden in vitro, dat er als gevolg van het ontstekingsproces allerlei stoffen worden gevormd door zowel bacteriën als infiltraatcellen, die een stimulerende invloed op osteoclastvorming en mineraalafbraak kunnen hebben. In dit verband is de stof 'Osteoclast Activating Factor' (OAF), een product gevormd door geactiveerde humane lymfocyten, van belang. Al in 1972 is door Horton en medewerkers aangetoond dat

lymfocyten uit het perifere bloed na stimulatie met plantelectinen een lymfokine vormen, 'Osteoclast Activating Factor' genaamd, die de botafbraak in pijpbeentjes in vitro versnelt.⁹ Het effect van OAF, alsmede dat van andere lokaal werkende stoffen als prostaglandinen, is echter nog nooit nagegaan op osteoclastenprecursoren uit beenmerg. Het onderzoek aan de afdeling Orale Celbiologie van de Vrije Universiteit zal er dan ook in de naaste toekomst op zijn gericht om de mogelijke regulerende rol van lokaal werkende ontstekingsfactoren als lymfokinen en prostaglandinen bij het ontstaan en de activiteit van deze osteoclasten te bestuderen.

Summary:

Title: Relationship between osteoclasts and macrophages – consequences for the mechanism of loss of bone in periodontal disease.

Keywords: Periodontology – Loss of bone – Origin of osteoclasts

Localized destruction of bone, cementum and dentin is accomplished by osteoclasts, cells that

in form and function resemble macrophages to a certain extent. Macrophages develop from peripheral blood monocytes, which are born in the bone marrow.

In this article experiments are reported that have shown that osteoclasts and macrophages are indeed related cells, that develop from a common precursor in the bone marrow. Mature tissue macrophages however should not be considered as osteoclast precursor cells as they have lost the capacity of forming osteoclasts in the course of maturation.

Literatuur:

1. Walker DG. Control of bone resorption by haematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *J Exp Med* 1975; 142: 651-660.
2. Kahn AJ, Simmons DJ. Investigations of cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. *Nature* 1975; 258: 325-327.
3. Furth R van. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Seminars in Hematology* 1970; 7: 125-135.
4. Mundy GR, Altman AJ, Gondek MD, Bandellin JG. Direct resorption of bone by hu-

man monocytes in vitro. *Science* 1977; 199: 1109-1110.

5. Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol* 1981; 52: 477-491.
6. Burger EH, van der Meer JWM, van de Gevel JS, Gribnau JC, Thesingh CW, van Furth R. In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1982; 156: 1604-1614.
7. Metcalf D, Moore MAS. Haemopoietic cells. Amsterdam: North Holland 1971.
8. Meer JWM van der, van de Gevel JS, Dieselhoff-den Dulk MMC, Beelen RHL, van Furth R. Long-term culture of murine bone marrow mononuclear phagocytes. In: Mononuclear phagocytes: Functional aspects. R. van Furth, editor. Den Haag: Martinus Nijhoff, 1980: 343-351.
9. Horton JE, Ráics LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* 1972; 177: 793-796.

April 1983.

Adres:

Mevr. Prof. Dr. E. H. Burger,
De Boelelaan 1115,
1081 HV Amsterdam.

EXPERIMENTELE GELOKALISEERDE PARODONTALE AFBRAAK IN DE BEAGLE-HOND

SAMENVATTING

J. P. RODENBURG

Trefwoorden: Parodontologie – Dierexperiment

Het doel van parodontale behandeling is primair het voorkómen van verder verlies van (bindweefsel-)aanhechting. In het verleden hebben verscheidene onderzoekers beweerd dat 'nieuwe aanhechting' ontstond als gevolg van hun parodontale behandeling. Onder 'nieuwe aanhechting' verstaat men de vorming van een nieuwe cementlaag, waarin collageenvezels zijn ingebed, langs dat deel van het wortelopervlak dat voordien was blootgesteld aan plaque.

De laatste jaren heeft men onderkend dat klinische metingen, zoals met de pocketsonde en röntgenfoto's, onbetrouwbaar zijn als methode om het werkelijke aanhechtingsniveau voor en na behandeling vast te stellen. Om die reden moet 'nieuwe aanhechting' histologisch worden bepaald.

Recent toonden Nyman e.a.¹ een enkele histologische bevinding van nieuwe aanhechting na toepassing van een gemodifi-

ceerde lap-techniek, met gebruikmaking van een millipore filter. Dit filter was bedoeld om cellen van het parodontale ligament de gelegenheid te geven het gebied naast het blootgestelde wortelopervlak te vullen.

Voor dit soort onderzoek onder gecontroleerde omstandigheden is het gebruik van een diermodel noodzakelijk. Naast andere diersoorten is vooral de beagle-hond door velen verkozen voor dergelijke studies. In de jaren zeventig werd een methode ontwikkeld om kunstmatige parodontitis en parodontale afbraak te creëren door het plaatsen van katoenen- of elastieken-ligaturen rond de kronen van de elementen, te zamen met een dieet dat plaquevorming bevordert. Uit recent onderzoek is gebleken dat een beperkt, maar significant herstel van de parodontale weefsels optreedt na verwijdering van de ligaturen. Het oorspronkelijke model met 'actieve parodontitis' verandert in een model met 'stabiele parodontale defecten' (Jansen²).

Ten gevolge van de gelijkmatige parodontale afbraak zijn de pockets in dit ligatuurmodel relatief ondiep. Om die reden leek het nodig een experimenteel model te ontwikkelen met gelokaliseerde parodontale defecten met relatief diepe pockets. Het doel van deze studies was om de stabiliteit van lokaal gecreëerde parodontale laesies te onderzoeken in een longitudinaal, klinisch experiment, gedurende een periode van 60 weken na verwijdering van de plaque-retentie-apparatuur. In een vervolgstudie werd het genezingsvermogen na reconstructieve therapie onderzocht.

De experimenten werden uitgevoerd bij 5 beagle-honden. Lokale parodontale afbraak werd gecreëerd langs de mesio-linguale zijde van de onderpremolaren, met verticale metalen pinnen bedekt met een elastisch materiaal (Rodenburg e.a.³). Na 24 weken werden de pinnen verwijderd en klinische startmetingen werden verricht (week 0). Vervolgens werden iedere vier weken klinische waarnemingen uitgevoerd, bestaande uit registratie van sondeerdiepte, klinisch aanhechtingsniveau en bloeding na sonderen met gebruikmaking van een 'druksonde' met een gestandaardiseerde druk van 0,75 N (Van der Velden en De Vries⁴).

De resultaten in de eerste helft van het onderzoek toonden aan dat van de 28 gecreëerde defecten 22 stabiel bleven over