

Parodontale ontsteking*

Biochemische merkers voor parodontale ontsteking in sulcusvloeistof

Samenvatting. Aan de hand van een literatuuroverzicht worden de mogelijkheden besproken om door middel van biochemische analyse van de sulcusvloeistof in een vroeg stadium ontstekingen van het parodontium op te sporen.

KINT JA. Parodontale ontsteking. Biochemische merkers voor parodontale ontsteking in sulcusvloeistof. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 1992; 99: 249-50.

J.A. Kint, biochemicus

* Dit artikel is een bewerking van een voordracht die tijdens de bijeenkomst van de Nederlandse Vereniging voor Biologie van de Mond d.d. 12 oktober 1990 werd gehouden.

Uit de Kliniek voor Kinderziekten van het Universitair Ziekenhuis te Gent.

Trefwoorden: **Parodontologie – Biochemie – Sulcusvloeistof**

Datum van acceptatie: 20 december 1991.

Adres: J.A. Kint, Universitair Ziekenhuis, De Pintelaan 185, 9000 Gent.

1 Inleiding

Bestudering van de literatuur van de laatste jaren (1986-1991) leverde 126 referenties op die de samenstelling van sulcusvloeistof tot onderwerp van onderzoek hadden. Sulcusvloeistof is, zoals men weet, een osmotisch transsudaat of een inflammatoir exsudaat dat in de gingivale sulcus kan voorkomen. Niet minder dan 18 biochemische parameters worden als mogelijk bruikbare factoren genoemd: lysosomale enzymen zoals β -glucuronidase of arylsulfatase,^{1, 2} cytoplasmatische enzymen zoals lactaat dehydrogenase,³ de vloeistofgeleidbaarheid, de Fe^{+2} - of de Fe^{+3} -concentratie,⁴ de pH, de aanwezigheid van polyaminen, glycosamino-glycinen, totaal igG, igA of igM, α -2-macroglobuline, esterase-activiteit, peroxidase-activiteit, elektroforese van serumproteïnen, het fibronectinegehalte, de activiteit van het lipase of collagenase en, ten slotte, het prostaglandinegehalte.

Al deze biochemische parameters bieden ieder voor zich een interessant perspectief voor een succesvol onderzoek van het ontstekingsproces in de mond. Niettemin is geen enkele van hen tot nu toe een definitieve 'beste keuze' gebleken. Buiten de hierboven vernoemde factoren zijn recentelijk verschillende andere moleculen een potentiële kandidaat gebleken als merker van het ontstekingsproces in de mond: C-reactief proteïne, N-acetyl- β -hexosaminidase iso-enzymen, lectinen, het gebruik van chemoluminescentie, en het gebruik van nieuwe typen van antiserum.

2 C-reactief proteïne (CRP)

C-reactief proteïne (CRP) werd door Tillett en Francis in 1930 ontdekt,⁵ toen bleek dat serum van patiënten met pneumonie een sterke reactie vertoonde met een zogenaamde fractie 'C', geïsoleerd uit de wand van pneumokokken. De CRP-spiegel in serum is waarschijnlijk de meest gevoelige parameter van ontsteking die op dit ogen-

blik bekend is. Men spreekt in dit verband ook wel eens van 'acute-fase-merker'. De CRP-concentratie stijgt tijdens de beginfase van een ontsteking tot 200 à 1000 maal de normaalwaarde. Daardoor is het een eerste keuze geworden als ontstekingsmerker in het serum. In de sulcusvloeistof was de aanwezigheid ervan tot nu toe nog niet gerapporteerd. Door middel van een zeer gevoelige 'ELISA'-test (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) is inmiddels aangetoond dat CRP inderdaad aanwezig is in sulcusvloeistof, zij het dat het om extreem lage concentraties gaat (tab. I): bij drie patiënten met parodontitis vonden we 0,9 tot 2,5 nanogram per milliliter, terwijl bij gezonde patiënten het CRP-gehalte minder dan 0,1 nanogram per milliliter bedroeg. Ter vergelijking: in serum van gezonde personen zonder ontsteking vindt men 300 tot 700 nanogram per milliliter.

3 N-acetyl- β -hexosaminidase

Tijdens de beginfase van de ontsteking wordt het lysosomaal apparaat geactiveerd. Dit resulteert niet alleen in stijging van de activiteit van de hydrolasen in het lysosoom, maar ook in de extra-celulaire vrijstelling van deze katabole enzymen. Daarenboven verandert op dat ogenblik ook de structuur van deze enzymen: hun suikerzijketen krijgt een andere samenstelling, bijvoorbeeld omdat een siaalzuur wordt afgesplitst. Daarom zijn deze hydrolasen bijzonder geschikt om de status van het parodontale proces te volgen.⁶

Van de verschillende glycosidasen is vooral het N-acetyl- β -hexosaminidase en het β -glucuronidase interessant omdat beide enzymen gemakkelijk met behulp van fluorimetrie kunnen worden gemeten. Naast de totale activiteit geeft ook het zogenaamde iso-enzymenpatroon nuttige informatie over het ontstekingsproces. N-acetyl- β -hexosaminidase vertoont drie isovormen in basale toestand, maar tijdens een acute ontsteking kunnen tot 11 banden worden waargenomen. Iso-elektrisch focuseren is een bijzondere elegante methode om deze isovormen op te sporen.

4 Lectinen en de structuur van de glycoproteïnen

Meer en meer wordt duidelijk dat tijdens de ontsteking heel wat serum glycoproteïnen van structuur veranderen. Meer in het bijzonder verandert de suikerzijketen vrij snel als gevolg van diverse ontstekingsignalen. Daardoor heeft het gebruik van zogenaamde 'lectinen' heel wat interesse gewekt. Lectinen zijn namelijk eiwitten die op een specifieke manier diverse suikermoleculen kunnen herkennen en er zich aan binden. Ze zijn dus te beschouwen als 'anti-suikerantilichamen'. Met behulp van de zogenaamde 'crossed affino-immuno-electrophorese' combineert men de specificiteit van de antilichamen gericht tegen een of ander proteïne, bijvoorbeeld transferrine, met die van een lectine gericht tegen een bepaald suiker, bijvoorbeeld galactose. De methode vergt erg weinig vloeistof (één of

Tabel I. Concentratie van CRP in sulcusvloeistof.

Normale controles (n=5)	< 0,1 nanogram per ml
Parodontale ontsteking (n=4)	0,9-2,5 nanogram per ml (gemiddelde 1,6 ng/ml)
CRP = C-reactief proteïne	

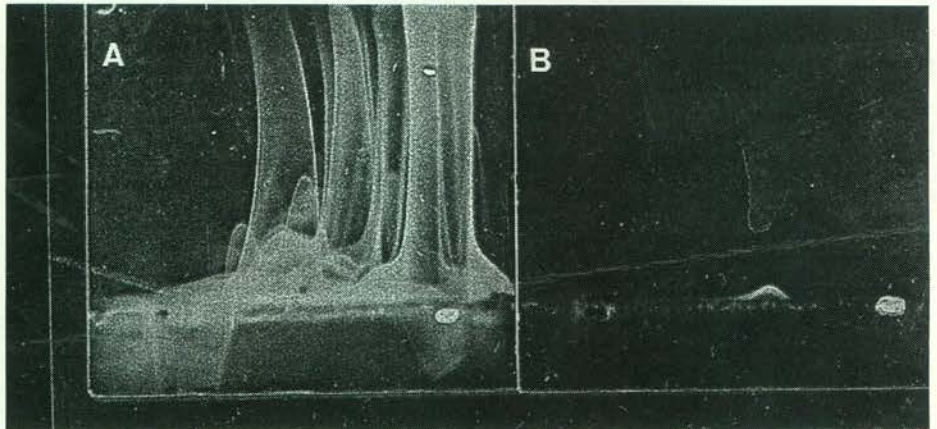
twee microliter), waardoor ze bij uitsteking geschikt is voor toepassing met sulcusvloei-stof.

5 Immunoblotting en chemoluminescentie

De detectie van eiwitten en andere macromoleculen op nitrocellulose is onlangs sterk verbeterd door de introductie van chemoluminescente substraten. Deze moleculen hebben de eigenschap dat ze onder de juiste omstandigheden licht beginnen uit te zenden dat op een fotografische plaat kan worden geregistreerd. Dit laat een extreem gevoelige detectie toe. Vooral het nieuwe substraat voor alkalische fosfatase 'adamantyl 1,2 dioxetaan fosfaat' is veelbelovend. Van immunoblots kunnen na 10 à 30 min. beelden worden verkregen, nadat men ze met een gevoelige film in contact heeft gebracht. De gehele procedure (elektroforese, immunoblotting, enzymreactie en luminiscentiedetectie) kan tijdens één enkele werkdag worden uitgevoerd. Bovendien is de techniek gemakkelijk aan te leren, ook door niet-gespecialiseerd personeel.

6 Kippen-antilichamen uit eierdooier

Voor de detectie en bepaling van eiwitten in biologische vloeistoffen, zoals sulcusvloei-stof, heeft men soms relatief grote hoeveelheden antistof nodig. Nefelometrie en turbidimetrie vergen dikwijls 100 µl en méér per bepaling. Om dergelijke grote hoeveelheden te verkrijgen, zijn speciale maatregelen nodig. Zo is het mogelijk om antilichamen te isoleren uit de eierdooier van kippen die tevoren zijn gevaccineerd tegen het te onderzoeken antigeen.⁷ Na zuivering van de immunoglobulinen worden de overbodige lipiden verwijderd met een vloeistofextractie. Op die manier verkrijgt men een kristalheldere vloeistof met dezelfde titer als die in het bloed van de kip. In één maand kan men op deze manier met één enkele kip een halve liter antiserum bereiden. Daarenboven hoeft men het proefdier niet, zoals bij het konijn, voortdurend te pijnigen door een bloedafname. Men verzamelt gewoon de eieren. In een tijd waarin men streeft naar een meer pijnloos gebruik van proefdieren wint deze methode meer en meer aan belang. Wij waren in staat met behulp van een zelf bereid dooierantiserum aan te tonen dat sulcusvloei-stof transferrine bevat (afb. 1).



Afb. 1. Tweedimensionale immuno-elektroforese van humaan serum en van sulcusvloei-stof. A = Humaan serum (méér dan 20 eiwitpieken zichtbaar). B = Sulcusvloei-stof (alleen de piek van transferrine is zichtbaar).

7 Procollageen propeptide

Fibroblasten en andere matrixproducerende cellen synthetiseren procollageen type III als een precursor van het type III collageen (P III P). Dit procollageen wordt dan gesecreteerd in de extracellulaire ruimte. De aanwezigheid van dit procollageen peptide reflecteert de voortdurende synthese en afbraak van het bindweefsel. Recent

werd aangetoond dat bij regeneratie en bij ontsteking van leverweefsel relatief grote hoeveelheden van dit procollageen in het serum terecht komen. In sulcusvloei-stof werd tot nu toe nog geen onderzoek gedaan omtrent P III P. De recente introductie van een commerciële kit voor de bepaling van dit peptide biedt een ideale gelegenheid om een dergelijke studie uit te voeren.⁸

Summary

THE USE OF BIOCHEMICAL MARKERS IN THE EARLY DIAGNOSIS OF PERIODONTAL DISEASE: A REVIEW OF THE LITERATURE

Key words: Periodontics – Crevicular fluid – Biochemistry

Based on a review of the literature the possible application of biochemical markers in the early detection of periodontal disease is discussed, using crevicular fluid.

Literatuur

- ¹LAMSTER IB, HARTLEY LJ, OSHRAIN RL, GORDON JM. Evaluation and modification of spectrophotometric procedures for analysis of lactate dehydrogenase, beta-glucuronidase and arylsulphatase in human gingival crevicular fluid collected with filter paper strips. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 235-42.
- ²LAMSTER IB, VOGEL RI, HARTLEY LJ, DE GEORGE CA, GORDON JM. Lactate dehydrogenase, β-glucuronidase and arylsulphatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1985; 56: 139-47.
- ³LAMSTER IB, OSHRAIN RL, GORDON JM. Enzyme activity in human gingival crevicular fluid: considerations in data reporting based on analysis of individual crevicular sites. *J Clin Periodontol* 1987; 58: 614-21.
- ⁴MUKHERJEE S. The role of crevicular fluid iron in periodontal disease. *J Periodontol* 1987; 58: 22-47.
- ⁵TILLET WS, FRANCIS T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med* 1930: 561-70.
- ⁶LAMSTER IB, HARPER DS, FIORELLO LA, OSHRAIN RL, CELENTI RS, GORDON JM. Lysosomal and cytoplasmic enzyme activity, crevicular fluid volume and clinical parameters characterizing gingival sites with shallow to intermediate probing depths. *J Periodontol* 1987; 58: 614-21.
- ⁷KINT JA, HUYS A, LEROY JG. Egg yolk antibody for nephelometric immunoassay of transferrine in human serum. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1987; 95: B 215.
- ⁸Ria-gnost P III P OCFK, Behringwerke, Marburg AG, Duitsland.