Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/161800

File ID	161800
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Periodontitis in twins : smoking, microbiological and immunological aspects
Author	G.L. Torres de Heens
Faculty	Faculty of Dentistry
Year	2010
Pages	146
ISBN	978-90-9025050-2

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/328470

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting en Discussie

Parodontitis is een complexe, multifactoriele, chronische aandoening van de steunweefsels van de gebitselementen (het parodontium), en wordt gekenmerkt door ontsteking en afbraak bindweefsel en kaakbot (Pihlstrom et al. 2005). Het verloop van de aandoening wordt bepaald door de interactie tussen de bacteriën in de biofilm op het tandoppervlak en het afweersysteem van de gastheer resulterend in een verstoring van de bindweefsel en kaakbot homeostasis (Preshaw 2008). Sommige individuen blijken vatbaarder te zijn voor parodontitis dan anderen (Loos et al. 2008). Deze verhoogde vatbaarheid wordt grotendeels veroorzaakt door de immunologische ontstekingsreactie van de gastheer op de bacteriële tandplaque (Preshaw 2008). Deze immune respons op de bacteriële plaque kan gezien worden als een twee snijdend zwaard. Dat wil zeggen dat de respons in principe beschermend is en leidt tot de productie van antistoffen en migratie van polymorphonucleare leukocyten (PMNs) die verantwoordelijk zijn voor de verdediging tegen de bacteriële infectie. De ontstekingsreactie bij personen die vatbaarheid zijn voor parodontitis gaat echter gepaard met excessieve productie van destructieve enzymen en ontstekingsmediatoren resulterend in parodontale afbraak (Preshaw 2008). Het is eigenlijk paradoxaal dat de in principe beschermende ontstekingsreactie tevens oorzaak is van de afbraak van de harde en zachte weefsels van het parodontium. Hoewel bacteriën de ontstekingsreactie in de weefsels initiëren, blijken genetische en life style factoren, zoals roken, de ontstekingsreactie te beïnvloeden waardoor deze bepalend zijn voor de ernst en progressie van de parodontitis (Kornman 2008, Loos et al. 2008, Page et al. 1997, Palmer et al. 2005, Pihlstrom et al. 2005, Preshaw 2008).

Het oorspronkelijke doel van het huidige proefschrift was om te onderzoeken in welke mate genetische variaties bepalend zijn voor de fenotypische variatie van matige tot ernstige chronisch parodontitis. Evaluatie van de interactie tussen genetische factoren aan de ene kant en de invloed van lifestyle factoren en bacteriën aan de andere kant, zijn van groot belang om een beter begrip te krijgen van de etiologie van chronische ziekten zoals parodontitis. Bij het onderzoek naar de genetische achtergrond van multifactoriële aandoeningen vormen tweelingen onderzoek een belangrijke bron van informatie. Op dit moment lijken de resultaten van het beschikbare tweelingen onderzoek in de richting

wijzen dat de erfelijke aanleg een belangrijke component is de etiologie van parodontitis (Corey et al. 1993, Michalowicz 1994, Michalowicz et al. 1991a, Michalowicz et al. 1991b, Michalowicz et al. 2000, Michalowicz et al. 1999, Mucci et al. 2005). Echter, deze bevindingen dienen voorzichtig geïnterpreteerd te worden aangezien de resultaten gebaseerd zijn op parodontale bevindingen die verkregen zijn uit onderzoek met behulp van enquêtes en niet op basis van klinische gegevens (Corey et al. 1993, Mucci et al. 2005) of bij patiënten populaties die niet op de aanwezigheid van parodontitis zijn geselecteerd (Michalowicz et al. 1991a, Michalowicz et al. 1991b, Michalowicz et al. 2000). Tot nu toe zijn bij al het tweelingen onderzoek, de tweelingen niet geselecteerd op basis van de aanwezigheid van matige tot ernstige parodontitis maar enkel en alleen op basis van hun tweelingen status. Als gevolg hiervan kan men zich dus nog steeds afvragen in welke mate de genetische aanleg bijdraagt tot het ontstaan van matige tot ernstige parodontitis. Omdat bij parodontitis de wisselwerking tussen de genetische aanleg voor de aandoening en de life style factor roken zo belangrijk is werd vooruitlopend op eigen onderzoek bij tweelingen eerst het effect van roken op de aangeboren en verworven immuunrespons bij parodontitis onderzocht. Deze benadering zou kunnen helpen om fenotypische variaties tussen ééneiige tweelingen te verklaren.

Onderzoek heeft aangetoond dat gemiddeld 50% van de parodontitis patiënten rokers zijn (Bergstrom 1989, Tonetti 1998, van der Weijden et al. 2001, Xu et al. 2002). Dit percentage is hoog vergeleken met het gemiddelde van de Nederlandse bevolking waarvan ongeveer 27% rookt (Tabakspreventie 2008). In het algemeen worden rokers als de moeilijkst te behandelen patiënten beschouwd. Rokers hebben vaak ernstiger parodontitis dan niet-rokers en reageren minder goed op de behandeling van parodontitis dan niet-rokers (Johnson & Hill 2004, Kinane & Chestnutt 2000, Palmer et al. 2005, Tonetti 1998). Bovendien heeft roken een grote invloed op het afweersysteem (Graswinckel et al. 2004, Kinane and Chestnutt, 2000, Loos et al. 2004, Palmer et al. 2005).

Bij de pathogenese van parodontitis spelen T-cellen een belangrijke immunoregulerende rol (Gemmell et al. 2007, Kinane & Lappin 2001, Seymour et al. 1996). Aanwijzingen op basis van histologische analyse van ontstoken parodontaal weefsel en *ex vivo* cytokine productie van parodontitis patiënten en gezonde controles,

ondersteunen het concept dat parodontitis een Th2-type aandoening is (Gemmell et al. 2007). Echter, er was nog niet onderzocht of roken de Th2 respons bij parodontitis zou kunnen versterken, dit terwijl toch minstens de helft van de parodontitis patiënten rokers zijn. Deze veronderstelling vormde de basis voor onze eerste studie. In *Hoofdstuk 2*, werd de T cell sturende respons van de monocyten (Th1/Th2) en de pro-inflammatoire cytokine produktie in *ex vivo* volbloed cel kweken van rokende en niet rokende parodontitis patiënten onderzocht. Bij 29 patiënten (18 niet-rokers en 11 rokers) die in de nazorg zaten werd veneus bloed afgenomen waarna dit vervolgens 10 keer werd verdund voor volbloed kweken. De volbloed cel kweken werden gedurende 18 uur gestimuleerd met zowel *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide (LOS) als een sonisch extract van *Porphyromonas gingivalis* (Pg-SE). Vervolgens werd in het supernatant de productie van zowel de T cel sturende cytokines interleukine IL-12p40 en IL-10, als de pro-inflammatoire cytokines IL-1β, IL-6 and IL-8 bepaald. Eerdere studies hebben aangetoond dat monocyten/macrofagen de belangrijkste bron zijn van de genoemde cytokinen (van der Pouw Kraan et al. 1997, van der Pouw Kraan et al. 1995). Uit onze gegevens blijkt dat parodontitis patiënten die roken hebben een lagere IL-12p40/IL-10 ratio na LOS stimulatie en een lagere IL-1β produktie na LOS en Pg-SE stimulatie hebben dan hun niet-rokende tegenhangers. Deze resultaten suggereerden een versterkte Th2 immuun respons bij rokende parodontitis patiënten.

Ondanks dat onze bevindingen een verhoogde Th2 respons na monocyten stimulatie bij rokende parodontitis patiënten suggereerden, was een verdere bevestiging dat T cellen een dergelijk cytokine patroon tot expressie brengen gewenst. Daarom werd vervolgens in *Hoofdstuk 3*, de cytokine produktie van de Th1 en Th2 subpopulaties bestudeerd in rokers en niet-rokers met en zonder parodontitis. Volbloed cel kweken werden gestimuleerd met specifieke T cel stimulatoren waarna IFN-γ en IL-13 werden gemeten representatief voor respectievelijk de Th1 en Th2 respons. De resultaten lieten zien dat rokers meer lymfocyten hadden, en een hogere produktie van IFN-γ en IL-13 dan niet rokers, ongeacht het feit of ze parodontitis hadden. In a multivariabele analyse werd echter gevonden dat de toegenomen IFN- γ productie niet verklaard werd door roken terwijl de toegenomen IL-13 productie wel sterk verklaard werd door roken. De IFN- γ en IL-13 produktie was onafhankelijk van elkaar wat aantoont dat ze door twee

verschillende T cel populaties werden geproduceerd (d.w.z. Th1 and Th2 type). Op basis hiervan kan worden verondersteld dat de verhoogde Th activiteit en in het bijzonder het versterkte Th2 profiel bij de rokers een risico factor vormt voor patiënten die roken. Bij hen zou door het roken een stabiele situatie kunnen worden omgezet in een progressieve laesie. Door middel van dit onderzoek konden wij onze eerdere bevindingen met betrekking tot het cytokine profiel van monocyten bevestigen. Het Th2 profiel van monocyten van parodontitis patiënten die roken komt overeen met de cytokine produktie door de lymfocyten.

Onze resultaten hebben verschillen laten zien tussen rokende en niet rokende parodontitis patiënten voor wat betreft de *ex vivo* volbloed cel kweek cytokine productie. IL-12 en IL-10 zijn belangrijke cytokinen bij de aangeboren immuniteit die ook een groot effect hebben op de verworven immuniteit (Seymour & Gemmell 2001). IL-12 expressie speelt een belangrijke rol in het bepalen van het Th1 respons door de inductie van IFN-γ secretie (Tsai et al. 2005). IL-10 daarentegen, verlaagt de productie van IFN-γ waardoor de Th1 respons wordt onderdrukt (Lappin et al. 2001). Verder is IL-1 betrokken bij een verhoogde IFN-γ productie door Th1 cellen, een verlaagde IL-4 productie door Th2 cellen (Sandborg et al. 1995, Schmitz et al. 1993) en wordt geremd door roken (Pabst et al. 1995). Samenvattend lijkt de lagere IL-12p40/IL-10 ratio en lagere IL-1β productie bij de onderzochte groep rokers indicatief te zijn voor een versterkte Th2 response (*Hoofdstuk 2*), dit werd bevestigd door een hogere IL-13 productie door de Th2 cellen van rokers (*Hoofdstuk 3*).

Het wordt algemeen aangenomen dat er een shift optreedt van een voornamelijk T cel naar B cel laesie bij de overgang van gingivitis naar parodontitis. Men zou kunnen veronderstellen dat tijdens het ontstaan van parodontitis er een verandering van cellulaire immuniteit (Th1) naar de humorale immuniteit (Th2) optreedt (Kinane & Lappin 2001). Het blijkt dat bij gingivitis meer T- dan B cellen worden aangetroffen terwijl bij parodontitis de B cellen overheersen (Kinane & Lappin 2001). De dominantie van B-cellen/plasma cellen bij de gevorderde/progressieve laesie suggereert een rol voor de Th2 cellen bij parodontitis. Zowel Th1 en Th2 cellen induceren B cel proliferatie, echter de Th2 cellen zijn hierin meer efficiënt dan de Th1 cellen (Rothermel et al. 1991). Daarnaast, kunnen geactiveerde B cellen bijdragen tot het uitbreiden en handhaven van

een dergelijke immune respons (Harris et al. 2000). Het is daarom plausibel dat een versterkte Th2 respons bij rokers kan leiden tot een verhoogde B cell proliferatie, waardoor een versterkte humorale respons wordt geïnduceerd, dat op zijn beurt de bestaande Th2 respons versterkt met als gevolg een toegenomen risico op steeds terugkerende parodontale afbraak bij rokers.

B cellen hebben de mogelijkheid om multifunctionele cytokinen zoals IL-6 en tumor necrosis factor (TNF)-α te kunnen aanmaken, die de diverse aspecten van botresorptie en het ontstaan van ontstekingen reguleren (Harris et al. 2000). Deze cytokinen kunnen botafbraak direct induceren of indirect door de productie aan te tasten van factoren die essentieel zijn voor de osteoclast differentiatie (Boyce et al. 2005, Gemmell et al. 1997). Daarom zou men kunnen veronderstellen dat deze bot resorberende cytokinen die geproduceerd worden door verhoogd geactiveerde B cellen kunnen bijdragen tot parodontale afbraak bij rokers. Bovendien zou de verstrekte B cel stimulatie ook kunnen bijdragen tot een verhoogde antilichaamproductie. Het is ook bekend dat autoimmunologische mechanismen zouden kunnen bijdragen in de pathogenese van parodontitis (Rajapakse & Dolby 2004). Een recent onderzoek liet zien dat autoantilichamen tegen de extracellulaire matrix betrokken zijn bij de pathogenese van parodontitis (De-Gennaro et al. 2006). Daarnaast is de lokale productie van autoantilichamen tegen autoantigenen in granulatie weefsel van de parodontale laesie beschreven (Rajapakse & Dolby 2004). Met andere woorden autoimmunologische mechanismen opgewekt door de verhoogde B cel activatie zouden kunnen bijdragen aan de parodontale afbraak bij rokers. Voorgaande studies over de invloed van roken op de immuun respons bij parodontitis gaven belangrijke achtergrond informatie om verder onderzoek te doen naar de oorzaak van de ernst van de parodontale afbraak bij parodontitis patiënten. Het doel hiervan was om een kader te scheppen voor de data analyse van het tweelingenonderzoek.

De klassieke tweeling onderzoek werd gebruikt voor het bepalen van de bijdrage van genetische-, omgevings- en life style factoren zoals roken, in de etiologie van matige tot ernstige chronisch parodontitis. Voor het onderzoek in *Hoofdstuk 4* werden zowel eeneiige (MZ), als twee-eiige (DZ) tweelingen die samen waren opgegroeid gerekruteerd om de bijdrage te onderzoeken van de genetica, parodontale

pathogenen en life style factoren op het klinische fenotype. Voor deze studie was het uiterst belangrijk dat de tweelingen werden geselecteerd op basis van het feit dat bij ten minste één van de twee, de probandus, 5 mm of meer approximaal aanhechtingsverlies bij twee niet aan elkaar grenzende elementen aanwezig was. Uiteindelijk kon bij 10 MZ en 8 DZ tweeling paren de parodontale toestand, de aanwezigheid van parodontaal pathogene bacteriën, het opleiding niveau, roken en Body Mass Index (BMI) worden onderzocht. De belangrijkste bevinding van deze studie is het feit dat MZ tweelingen behoorlijk discordant waren met betrekking tot het aanhechtings verlies, het aantal en percentage elementen met AL ≥5 mm en het percentage elementen met botafbraak van ≥30%. De MZ probandi vertoonden de matige tot ernstige parodontitis op basis waarvan zij geselecteerd waren, terwijl de MZ co-tweelingen die niet op parodontitis waren geselecteerd, altijd veel minder ernstige parodontitis vertoonden. Dit was een verrassend resultaat omdat op basis van eerder onderzoek verondersteld was dat erfelijkheid voor 50% bijdraagt aan de ernst van de parodontitis (Michalowicz et al. 2000) en er dus minder grote verschillen te verwachten waren bij de MZ tweelingen. Analyse van ons tweelingen materiaal liet zien dat het gebrek van concordantie niet te verklaren was door de aanwezigheid van de parodontale pathogene bacteriën, roken en BMI, factoren die een rol spelen bij de etiologie van parodontitis. Men moet zich echter wel realiseren dat het aantal tweelingen in het onderhavige onderzoek klein is. Dit geringe aantal zou verantwoordelijk kunnen zijn voor de vele niet significante verschillen zoals bijvoorbeeld de subgingivale aanwezigheid van *P. gingivalis*. Bij de MZ tweelingen waren 5 van de 10 probandi positief voor *P. gingivalis*, terwijl slechts 2 van de 10 co-tweelingen positief waren voor dit organisme. Een grotere onderzoekspopulatie zou hebben kunnen aantonen dat *P. gingivalis* wel degelijk een significante rol speelt in de etiologie van parodontitis. Roken, als verklarende variabele kon niet in de MZ groep geanalyseerd worden gezien hun identieke rookgedrag. Dit was wel mogelijk bij de DZ tweelingen omdat hierbij wel een verschillend rookgedrag aanwezig was tussen probandi en co-tweelingen. Bij de DZ tweelingen kon 45.6% van verschil in de parodontale afbraak worden verklaard door roken. Bij de MZ tweelingen was de discordantie in parodontale afbraak kleiner dan bij de DZ tweelingen. Deze bevinding is in overeenstemming met de literatuur.

Aangezien immunologische reacties een belangrijke rol spelen bij de parodontale afbraak, was het interessant om de cytokine productie van de leukocyten van deze tweeling populatie te onderzoeken om een mogelijke verklaring te vinden voor de discrepantie in het parodontale fenotype tussen de MZ en DZ tweelingparen. In *Hoofdstuk 5*, werd bij deze tweeling populatie de mate van concordantie in aantal leukocyten en hun cytokine productie na *ex vivo* stimulatie onderzocht. Wanneer de data van MZ en DZ tweelingen worden gecombineerd blijkt dat probandi een hoger aantal leukocyten hadden en minder IL-12p40 productie vertoonden dan hun co-tweelingen. Dit verhoogde aantal leukocyten is vergelijkbaar met eerdere bevindingen in de literatuur waarbij een ernstiger vorm van parodontitis ook is gerelateerd aan een verhoogd aantal leukocyten bij deze patiënten (Loos 2005). Het is ook bekend dat een lagere IL-12p40 productie de Th2 immuniteit bevordert en de stimulatie van de Th1 immuun respons vermindert. De grotere mate van botafbraak bij MZ en DZ probandi in vergelijking met hun co-tweelingen en de lagere IL-12p40 productie is in overeenstemming met de karakteristieke Th2 respons bij parodontitis. Bovendien produceerden MZ probandi meer IL-6 dan hun co-tweelingen. Dit beeld is in overeenstemming met eerder onderzoek waaruit blijkt dat met toenemende ernst van de parodontitis de IL-6 productie ook toeneemt (Loos et al. 2000). IL-6 is een multifactorieel cytokine met o.a. als functie B-lymfocyten differentiatie, T-lymfocyten proliferatie en stimulatie van immunoglobuline productie door B-lymfocyten (Hirano et al. 1990). Een belangrijk aspect van IL-6 is dat het botresorptie kan induceren zowel zelfstandig als in combinatie met andere bot resorberende stoffen (Ishimi et al. 1990). Dit leidt tot de conclusie dat binnen onze tweeling populatie, de hogere IL-6 productie door de MZ probandi geassocieerd lijkt te zijn met de sterkere bot afbraak in deze groep. De resultaten suggereren dat het gebrek aan een sterke concordantie in parodontale afbraak bij de MZ tweelingen niet verklaard kan worden door verschillen in het aantal leukocyten, maar dat de lagere productie van IL-12p40 en hogere IL-6 productie na *ex vivo* stimulatie beschouwd zou kunnen worden als risico factoren voor de ernst van parodontitis.

Op basis van de resultaten bij onze tweelingen populatie komen wij tot de veronderstelling dat de rol van genetische factoren bij parodontitis wel eens overschat zouden kunnen zijn. De genetische aanleg van de gastheer, de klassieke lifestyle factoren

en de immuunrespons na stimulatie van de afweer cellen konden niet het gebrek in concordantie van de parodontale afbraak, speciaal bij MZ tweelingen verklaren. Dit impliceert dat andere factoren een belangrijke rol spelen en de ernst uitgebreidheid van de ziekte bepalen. Er zijn verschillende mogelijkheden. Bijvoorbeeld, voeding en dieet supplementen zijn geassocieerd met de ontstekingsreactie en ernst van parodontitis (Amaliya et al. 2007, Rosenstein et al. 2003, Staudte et al. 2005). Een calorie-arm diet vertraagt de ontstekingsreactie en vermindert actieve parodontale afbraak bij een experimenteel geïnduceerde parodontitis (Branch-Mays et al. 2008). Daarnaast, zou suppletie met visolie een positief effect hebben op het afweer systeem en daardoor een rol kunnen spelen in de preventie en/of ondersteuning bij behandeling van parodontitis (Bendyk et al. 2009). Een andere mogelijke verklaring van de gevonden discordantie in de parodontale afbraak bij tweelingen zouden virale infecties kunnen zijn. Herpes virus infecties zou de parodontale afbraak kunnen initiëren of versnellen door stimulatie van gastheer cellen om cytokinen uit te scheiden. De hieruit voortvloeiende ontsteking zou de afweer mechanismen van de gastheer kunnen verstoren met als resultaat een minder effectieve respons tegen de aanwezige paropathogene bacteriën (Contreras et al. 2000, Slots 2007).

Gedurende de laatste jaren zijn er in toenemende mate aanwijzingen dat, alhoewel genetische factoren de immunologische afweer bepalen, epigenitische mechanismen buitengewoon belangrijk zijn voor de regulatie van de ontstekingsreactie (Offenbacher et al. 2008). Epigenetische veranderingen worden veroorzaakt door een remodeling van de chromatine structuur ten gevolge van DNA methylering en histone acetylering waardoor genen selectief kunnen worden geactiveerd en gedeactiveerd en hun expressie wordt bepaald. In het algemeen veroorzaakt een toegenomen DNA methylering in de promotor regio van genen een verminderde expressie van dat gen (Franco et al. 2008). Doordat het epigenetische proces een verandering in cytokine profiel kan induceren, beïnvloedt het daardoor de pathogenese en uiteindelijk resultaat van vele infectieziekten (Gomez et al. 2009). Preliminaire data suggereren bijvoorbeeld dat het gen voor IL-6, een cytokine dat betrokken is bij de uiteindelijke differentiatie van B-cellen in immunoglobuline producerende cellen, in parodontitis weefsel een verminderde methylation vertoont ten op zichtte van controles. Deze preliminaire bevindingen suggereren dat bij parodontitis de

expressie van het IL-6 gen is geopreguleerd (ongepubliceerde gegevens, Offenbacher et al. 2008). Deze suggestie is in overeenstemming met de bevindingen in onze tweelingen studie waarbij gevonden werd dat na stimulatie van volboed kweken, de MZ probandi met matige tot ernstige parodontitis meer IL-6 produceerden dan hun co-tweelingen met geringe parodontale afbraak. Daarnaast is ook aangetoond dat infectie kan leiden tot epigenetische veranderingen van een imprinted gen van de gastheer (Bobetsis et al. 2007). Het zou dus zo kunnen zijn dat vroeger opgelopen infectie ziekten en/of virale infecties bij de MZ proband heeft geresulteerd in een genetische variatie met als consequentie het ontstaan van een ernstiger vorm van parodontitis. Helaas is slechts schaarse informatie beschikbaar over epigenetische veranderingen bij parodontitis. Hopelijk zal toekomstig onderzoek ons helpen te begrijpen hoe bijvoorbeeld de blootstelling aan systemische factoren zoals roken, het gehele epigenetische patroon verandert en de neiging om parodontitis te ontwikkelen beïnvloedt. Al met al kunnen bovengenoemde veronderstellingen de mate van expressie van ziekten beïnvloeden en kunnen dus ook het gebrek aan duidelijke concordantie in de parodontale toestand van de MZ tweelingen van het onderhavige onderzoek verklaren.

Het identificeren van personen die verhoogd vatbaar zijn voor parodontitis blijft een grote uitdaging voor de tandheelkundige praktijk. Preventie en behandelstrategieën op maat voor personen met een verhoogd risico zijn hoogst nodig. Hopelijk zullen studies met grotere aantallen tweelingen gericht op andere mogelijke factoren die immunologische afweer van de gastheer beïnvloeden meer licht werpen op de vraag waarom sommige personen parodontitis ontwikkelen en andere niet. Dit zou tevens kunnen bijdragen tot een effectieve preventie van het ontstaan en progressie van parodontitis. Bij de zoektocht naar de oorzaken van parodontitis lijkt onderzoek naar de interactie tussen genetische en epigenetische mechanismen enerzijds en de omgevings- en life stylefactoren anderzijds een aantrekkelijk gebied van onderzoek.