



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Immunological aspects of the pathophysiology of periodontitis

Moonen, C.G.J.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Moonen, C. G. J. (2019). *Immunological aspects of the pathophysiology of periodontitis*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

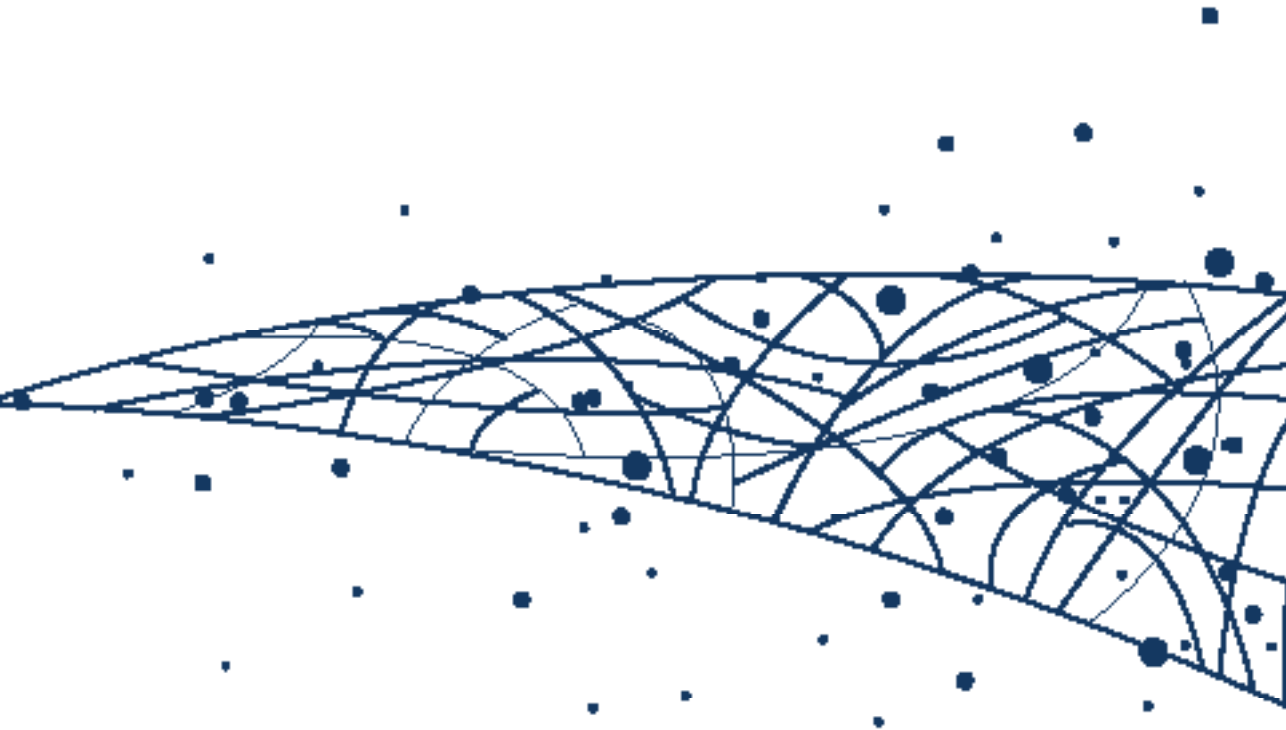
It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

9

Nederlandse samenvatting



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Immunologische aspecten van de pathofysiologie van parodontitis

Een ontsteking is in principe een beschermende reactie van het lichaam dat gericht is op het elimineren van de initiële oorzaak van weefselbeschadiging en het initiëren van het herstelproces. Een ontsteking kan worden geïnitieerd door fysisch of chemisch trauma of door vreemde substanties, waaronder micro-organismen (zoals bacteriën, virussen en schimmels). Zonder ontsteking kan verspreiding van infecties plaatsvinden en zou genezing een langzamer proces zijn. Hoewel ontstekingen helpen om schadelijke prikkels te verwijderen en het weefselherstel te vergemakkelijken, kan de ontstekingsreactie in combinatie met het daaropvolgende herstelproces wijdverspreide weefsel schade veroorzaken. Dezelfde mechanismen die bedoeld zijn om micro-organismen te doden en beschadigde weefsel te herstellen, hebben ook de potentie om het gezonde weefsel te beschadigen. Wanneer een microbe of zijn componenten (bijvoorbeeld lipopolysacchariden, LPS) een weefsel binnentreden of wanneer het weefsel is verwond, wordt de aanwezigheid van de bacteriële uitdaging of beschadiging gedetecteerd door de weefselcellen zoals macrofagen, dendritische cellen, mestcellen en andere celtypen. Een belangrijk aspect van een ontstekingsreactie is het vergemakkelijken van de toegang van immuuncellen en moleculen die in het bloed circuleren, waaronder circulerende witte bloedcellen (leukocyten) en plasma-eiwitten. Dit geeft dan ook de kenmerkende signalen van ontsteking: roodheid, zwelling, warmte, pijn en functieverlies.

De cellen van het immuunsysteem bestaan uit leukocyten en de cellen die lokaal zijn gespecialiseerd in dendritische cellen en macrofagen die in de weefsels aanwezig zijn. Leukocyten worden ingedeeld in verschillende subgroepen; lymfocyten (T-, B- en natural killer [NK]-cellen), granulocyten (neutrofielen of polymorfonucleaire leukocyten [PMNs], eosinofielen en basofielen), monoccyten en dendritische cellen.

Over het algemeen is de inflammatoire immuunrespons een meerdelig proces dat bestaat uit zowel de aangeboren als de verworven immuunrespons. De aangeboren immuunrespons vormt een natuurlijke, eerste lijn van afweer bijvoorbeeld via fysieke (huid, slijmvliesweefsels) en chemische barrières (afgescheiden vloeistoffen met antibacteriële eiwitten). Daarnaast omvat de aangeboren immune respons ook immuuncellen die micro-organismen herkennen en vervolgens doden en elimineren. De aangeboren immuunrespons is niet-specifiek, wat betekent dat deze immuuncellen algemene kenmerken herkennen die worden gedeeld door verschillende microbiële soorten en die niet specifiek zijn voor één bepaald micro-organisme. Leukocyten, zoals neutrofielen, macrofagen en monoccyten (cellen van het aangeboren immuunsysteem) worden gerekruteerd naar de plaats van ontsteking om de indringer te elimineren en de mogelijke bacteriële verspreiding te voorkomen door hun antimicrobiële functies uit te voeren.

Wanneer de aangeboren immuunrespons onvoldoende de ontsteking oplost, wordt de meer specifieke en verfijnde verdediging van de verworven immuunrespons geïnitieerd. Lymfocyten zijn immuuncellen van het verworven immuunsysteem die in het algemeen aanwezig zijn in weefsels en moleculen produceren (bijvoorbeeld cytokinen en chemokinen) die bijdragen aan de ontsteking door de instroom van meer ontstekingscellen in de ontstoken weefsels te induceren.

Talrijke micro-organismen bewonen de mondholte. In de mondholte zitten de tanden en kiezen stevig verankerd door steunweefsels: het parodontium, bestaande uit alveolair bot, parodontaal ligament, wortelcement en het tandvlees (gingiva). Bij personen met parodontale gezondheid is er een normale gastheer-microbe homeostase aanwezig, waarbij een symbiotisch laagje tandplak (biofilm) aanwezig is in de submarginale en subgingivale gebieden rondom de tanden. Met een toenemende tandplakmassa wordt echter een beschermende ontstekingsreactie van de gastheer geïnitieerd, welbekend als tandvleesontsteking (gingivitis). Deze reactie wordt beschouwd als een normale, tolerante ontstekingsreactie van de gastheer en is reversibel. Gingivitis wordt gekenmerkt door roodheid en zwelling en veroorzaakt bloedingen van de gingiva (in de volksmond bloedend tandvlees).

In het geval van een ongecontroleerde, niet-opgeloste en chronische ontsteking kan gingivitis echter mogelijk ontsporen tot parodontitis. De prevalentie van ernstige parodontitis varieert tussen ongeveer 7-14% van de West-Europese en Noord-Amerikaanse bevolking. Het pathologische kenmerk van parodontitis is osteoclast-gemedieerd alveolair botresorptie. Indien onbehandeld, kan parodontitis onomkeerbare schade aan het parodontaal ligament en het alveolaire bot veroorzaken, dat uiteindelijk tot loszittende tanden of zelfs tot tandverlies kan leiden. Parodontitis is een complexe chronische ontstekingsziekte met een niet-lineaire progressie en wordt veroorzaakt door verschillende factoren. Deze factoren kunnen gelijktijdig opspelen en met elkaar een wisselwerking aangaan. De factoren die gelijktijdig kunnen plaatsvinden bij de totstandkoming en de voortzetting van parodontitis zijn een onevenwichtige biofilm, genetische en epigenetische variaties, systemische ziekten zoals suikerziekte en leefstijlfactoren zoals roken en slechte voeding. Er is vastgesteld dat parodontitis in verband staat met andere (systemische) ziekten zoals diabetes en atherosclerotische cardiovasculaire aandoeningen (ACVD). De biologische mechanismen en de klinische relevantie van deze associaties worden nog onderzocht.

De immunologische aspecten van de ontstekingsreacties in het parodontium die uiteindelijk tot alveolaire botafbraak leiden in parodontitis, zijn niet volledig bekend. In dit proefschrift worden verschillende immunologische aspecten van de pathofysiologie van parodontitis beschreven. Dit proefschrift is onderverdeeld in een inleidend hoofdstuk met daarna vijf experimentele hoofdstukken die de verschillende immunologische aspecten

van de pathofysiologie van parodontitis beschrijven. De algemene bevindingen van dit proefschrift worden besproken in **Hoofdstuk 7**, waarin de belangrijkste resultaten in een breder perspectief worden geplaatst en de beperkingen van dit proefschrift worden behandeld.

De orale polymorfonucleaire leukocyten (oPMN) zijn de meest voorkomende immuuncellen die in de mondholte aanwezig zijn. Circulatoire PMNs (cPMNs) geïsoleerd uit bloed zijn al uitgebreid onderzocht en gekarakteriseerd met behulp van verschillende functionele proeven, terwijl er nog weinig bekend is over de oPMNs die aanwezig zijn in de mond. Het eerste experimentele hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 2**) beschrijft de verschillende kenmerken van de orale (oPMN) en uit bloed (cPMN) geïsoleerde PMNs. De verschillen tussen deze twee populaties werden gekarakteriseerd met betrekking tot hun chemotactische (verplaatsing van de cel), fagocyterende (het internaliseren van een microorganisme of macromoleculen) en neutrofiel extracellulaire net (NET)-vormingseigenschappen. In tegenstelling tot cPMNs vertoonden oPMNs verminderde capaciteit voor efficiënte directionele beweging (chemotaxis) die werd verklaard door significant lagere expressie van de receptor voor N-formylmethionyl-leucyl-fenylalanine (fMLP), wat een chemotactische factor is voor PMNs. De verminderde capaciteit voor beweging door de oPMNs kan het gevolg zijn van migratie door de orale weefsels in de mondholte. Verder werd een verhoogde adhesie en internalisatie van verschillende micro-organismen door oPMNs waargenomen. De oPMNs vormden 32 keer meer NETs dan ongestimuleerde cPMNs. De oPMNs dragen dus waarschijnlijk bij aan het in stand houden van een gebalanceerd oraal ecosysteem, door hun vermogen om microben te internaliseren in combinatie met hun overvloedige NET-productie na het binnentreden van de mondholte.

De ontstekingsimmunrespons bij parodontitis omvat de activering van PMNs die pathogenen kunnen 'vangen' en elimineren door NETs te produceren. Dit zou moeten volgen door een adequate NET-afbraak om zo de parodontale genezing te bewerkstelligen. Verminderde NET-afbraak kan een negatieve invloed hebben op parodontale ontsteking en het kan leiden tot het handhaven van een systemische pro-inflammatoire status in de bloedsomloop. Het is interessant om op te merken dat de verhoogde aanwezigheid van NETs in de bloedsomloop is geassocieerd met atherosclerotische cardiovasculaire aandoeningen (ACVD). Aan de ene kant spelen NETs een belangrijke beschermende rol tegen bacteriële verspreiding in de bloedbaan. Aan de andere kant is gevonden dat NETs een belangrijke rol spelen bij de vorming van atherosclerotische plaques en een pro-trombotische status, kenmerkend voor ACVD. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat parodontitis en ACVD sterk met elkaar geassocieerd zijn. Mogelijk is deze associatie ook te verklaren door een verhoogde aanwezigheid van NETs in parodontitis. Er is al gerapporteerd dat er geen verschillen zijn in NET formatie tussen in parodontitis patiënten en gezonde controles, hoewel er een verschil zou kunnen zijn in de NET afbraak. In **Hoofdstuk 3** onderzochten

we de *in vitro* NET-afbraakcapaciteit van bloedplasma van 38 parodontitispatiënten in vergelijking met 38 controles (deel 1). De NET-afbraakniveaus verschilden niet significant tussen parodontitispatiënten en controles. In tegenstelling tot andere onderzoeken hadden wij onze patiënten en controlepersonen niet 'gematched'. Hierdoor kunnen er verschillen in sociaal-demografische kenmerken, rookgewoonten en BMI zijn, die de vergelijking van NET-afbraak in het eerste deel van ons onderzoek zouden kunnen hebben beïnvloed. Desondanks resulteerden covariantie analyses in niet-significante verschillen, suggererend dat dit niet het resultaat was van een multifactoriële oorzaak-gevolg relatie.

Eerder onderzoek heeft de gunstige effecten van niet-chirurgische parodontale therapie op verschillende klinische en biochemische parameters van ACVD aangetoond. Derhalve, in deel 2 hebben we onderzocht of parodontale behandeling de NET-afbraak ten goede zou komen en dus een mogelijke reden zou kunnen zijn voor een verbeterd ACVD-profiel van deze patiënten. De NET-afbraakniveaus waren onderzocht in 91 patiënten voor en na (3, 6, en 12 maanden) parodontale behandeling. NET afbraakniveaus waren significant verhoogd met 10% na niet-chirurgische parodontale therapie en deze verhoogde capaciteit werd gehandhaafd gedurende 6 en 12 maanden. Het was ook interessant om te zien dat het systemisch antibiotica gebruik bij de behandeling bij ongeveer de helft van de patiënten geen extra invloed had op de verbeterde NET degradatie. We concluderen dat niet-chirurgische parodontale therapie gunstig is voor de NET-afbraakcapaciteit wat bovendien ook kan correleren met een gunstiger ACVD-profiel van deze patiënten.

De chronische inflammatoire cel-infiltratie van de parodontale zachte weefsels gaat gepaard met osteoclast-geïnduceerde alveolaire botresorptie, hét kenmerk van parodontitis. Het ligand van de receptoractivator van NF-KB (RANKL) is een belangrijk molecuul bij de vorming van de botafbrekende cellen: de osteoclasten. PMNs zijn een van de meest prominente cellen aanwezig in parodontitis laesies waar ze vaak worden geactiveerd of voorkomen in een hyperactieve toestand. Daarom veronderstelden we dat PMNs mogelijk een belangrijke rol zouden kunnen spelen in het leveren van signalen (i.e. RANKL) om de osteoclastogenese te activeren die de pathologische botafbraak bij parodontitis activeert. In **Hoofdstuk 4** hebben we geprobeerd om de bovengenoemde hypothese op twee manieren te onderzoeken. In deel A hebben we onderzocht of oPMNs, die hypergeactiveerde PMNs uit parodontitis-laesies vertegenwoordigen, RANKL tot expressie brengen. RANKL-expressie op de celmembraan werd ook onderzocht bij cPMNs en oPMNs van zowel gezonde controlepersonen als parodontitispatiënten. In beide celtypen was de RANKL-expressie minimaal en verschilde deze niet significant tussen parodontitispatiënten en controlepersonen. In deel B van deze studie hebben we onderzocht of cPMNs, na activering door bacteriële of immunologische modulators (lipopolysacchariden, interleukine (IL)-6, of tumor necrose factor (TNF)- α), het vermogen hebben om bij te dragen tot de vorming van osteoclasten, wederom via RANKL expressie. Een uitdaging in dit soort studies is de lange duur van de experimenten die leiden tot osteoclastvorming, terwijl

PMNs een korte levensduur hebben. Om deze discrepantie te overbruggen, hebben we PMNs gefixeerd, waardoor blijvende celmembraanexpressie van RANKL is gewaarborgd. Wederom werd heel beperkte RANKL-expressie aangetoond op (gestimuleerde) cPMNs. Bovendien induceerden deze beperkte expressieniveaus geen osteoclastvorming wanneer ze gedurende 10 dagen samen met voorloper-osteoclasten werden gekweekt. We rapporteren dat, onder de bovengenoemde experimentele omstandigheden, oPMNs en naïeve of inflammatoir-gestimuleerde cPMNs geen rol spelen in de osteoclastogenese.

Fibroblasten uit de gingiva (gingiva fibroblasten, GF) hebben het vermogen om osteoclastvorming te induceren en er wordt gedacht dat ze een rol spelen bij het rekruteren van immuuncellen naar het ontstoken parodontium. De interactie tussen GFs, immuuncellen en de voorlopers van osteoclasten (monocyten) was nog onbekend. In **Hoofdstuk 5** wilden we rol van de GFs in de osteoclastvorming onderzoeken, met name de interactie met andere immuuncellen zoals perifere mononucleaire bloedcellen (PBMCs) bestaande uit monocyten, T-, B-, en NK cellen. Na 21 dagen werden vergelijkbare aantallen osteoclasten waargenomen in GF-coculturen met monocyten en kweken met PBMCs. Er werden geen osteoclasten gevormd in afwezigheid van monocyten, hetgeen verder aangeeft dat de perifere bloedlymfocyten (PBLs), dus de combinatie van T-, B- en NK- cellen, aanwezig in GF-PBMC cokweken niet extra bijdroegen aan de osteoclastogenese. Maar een interessante ontdekking was dat er in de GF-PBMC en GF-PBL-cokweken hoge aantallen mononucleaire cellen werden waargenomen. Hier werden aanzienlijk meer T-, B- en NK-cellen gevonden in zowel GF-PBMC- als GF-PBL-cokweken in vergelijking met kweken zonder GFs op alle tijdstippen. Deze waargenomen lymfocytenoverleving correleerde met de expressie van lymfocyt-functie-geassocieerde antigeen-1 (LFA-1) -expressie, die significant hoger was in GF-PBL-kweken in vergelijking met GF-monocytkweken. Uiteindelijk toonden we aan dat alleen de T-cellen prolifereren in aanwezigheid van GFs. Met deze studie concludeerden we dat GFs, in de aanwezigheid van monocyten, een rol spelen in de osteoclastvorming. GFs spelen een rol in het binden en de overleving van lymfocyten en daarbij het stimuleren van de T-cel proliferatie.

Tijdens ontsteking van het tandvlees werken de GFs samen met cellen van het aangeboren en verworven immuunsysteem die een cruciale rol spelen bij de bescherming van de gastheer tegen pathogene infectieuze agentia. In het laatste experimentele hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 6**), werd het effect van chronische ontsteking, door PBMCs, PBLs en GF-PBMC-coculturen nagebootst door permanente blootstelling aan Toll-like receptor activatoren (TLR2 en TLR4). Toll-like receptoren zijn in en op de celmembraan gelegen herkenningseiwitten van bacteriële producten, zoals LPS. Het TLR systeem is onderdeel van de aangeboren immuniteit omdat deze receptoren met moleculen reageren zonder specificiteit. We onderzochten of een "chronische ontsteking" de binding, overleving en proliferatie van leukocyten beïnvloedt. Chronische stimulatie van PBMC-GF-cokweken met TLR2- en TLR4-activatoren verminderde het aantal NK-, T- en B-cellen. Anderzijds werd

het aantal monocyten niet beïnvloed. TLR2-activatoren verdubbelden de T-cel proliferatie in GF-PBMC-cokweken en in PBMCs kweken zonder GF. Gezien het netto verlies van T-cellen, moet een selectie van T-cellen gevoelig zijn om te delen na TLR-stimulatie. Verder induceerde chronische TLR2-activering van PBMCs zonder GF een pro-inflammatoire cytokineproductie (tumor necrose factor alpha en interleukine 1-beta) tot en met het eind van de kweekperiode (21 dagen), terwijl deze niet werden gedetecteerd in PBL-monoculturen, noch in TLR4-geactiveerde cellen. We concluderen dat TLR2-activatoren T-celproliferatie en pro-inflammatoire cytokineproductie door monocyten induceerden. Dit suggereert dat TLR2-activatie een brug vormt tussen de aangeboren en verworven immuniteit, omdat TLR activatie van het aangeboren immuunsysteem (monocyten) de cellen van het verworven immuunsysteem (T cellen) activeren.

Dit proefschrift draagt bij aan een meer gespecificeerd begrip van PMNs bij het handhaven van de mondgezondheid en de rol van GFs bij de retentie en overleving van lymfocyten (met name T cellen) en door de T-celproliferatie te activeren. Een beter begrip van osteoimmunologische processen waarbij tand-geassocieerde fibroblasten interacteren met aangeboren en verworven immuuncellen, heeft geleid tot verder inzicht in de pathogenese van parodontitis en kan vervolgens gebruikt worden om de gewenste homeostase voor de parodontale gezondheid te bewerkstelligen.