

# Marginal parodontitis og matriks-metalloproteinaser

## Autoreferat af ph.d.-afhandling

**Anne Havemose Poulsen**

Marginal parodontitis er en hyppigt forekommende inflammations sygdom, som medfører fæstetab. Der er stor variation i den individuelle sygdomstilbøjelighed, og sygdommen inddeles i fem undergrupper på basis af patienternes alder, når sygdommen opstår og hastigheden, hvormed sygdommen forløber. Sygdommens patogenese er ikke afklaret, men data tyder på, at nedbrydningen af de parodontale bindevæv involverer enzymerne matriksmetaloproteinaser. Hypotesen bygger på, at der er en positiv sammenhæng mellem sygdomsaktivitet og forekomsten af matriksmetaloproteinaser. For at belyse denne sammenhæng blev gingivale fibroblaster fra patienter med forskellige typer af marginal parodontitis og fra personer med sunde parodontale forhold isoleret og deres evne til at nedbryde type I kollagen via matriks-metalloproteinaser analyseret. Undersøgelsen viste, at gingivale fibroblaster fra patienter med juvenil parodontitis og langsomt progredierende voksen parodontitis generelt var dårligere til at nedbryde type I kollagen end fibroblaster fra parodontalt sunde kontrolpersoner.

*Referatet bringes som parallelpublikation i Tandlægernes Nye Tidsskrift*

**M**arginal parodontitis er karakteriseret ved større eller mindre nedbrydning af tændernes fæste: den alveolære knogle, gingiva, parodontalligament og rod cement. Sygdommens patogenese er ikke kendt i detaljer, men mikroorganismer, der koloniserer tandoverfladen, antages at være den væsentligste sygdomsinitierende faktor. Mikroorganismer kan medvirke til nedbrydningen af de parodontale væv ad tre forskellige veje: 1) ved selv at danne vævsnedbrydende enzymer, 2) ved at påvirke lokale værts-celler som keratinocytter og fibroblaster til at danne vævsnedbrydende enzymer eller 3) ved at fremkalde inflammation i tændernes støttevæv. Som led i inflammationsprocessen ophobes inflammationsceller som neutrofile granulocytter, T- og B-lymfocytter samt makrofager lokalt i vævet. Inflammationscellerne kommunikerer med hinanden og med lokale celler i vævet via cytokiner, som bl.a. kan stimulere lokale celler til at danne vævsnedbrydende enzymer.

Der er imidlertid stor individuel variation i tilbøjeligheden til at udvikle fæstetab. Nogle personer tåler store plakmængder på tænderne, uden at der opstår fæstetab, mens andre udvikler fæstetab med minimal plak på tænderne. Mængden af bakteriebelægninger på tænderne kan altså ikke alene forklare, hvorfor nogle udvikler fæstetab og andre ikke.

På basis af patienternes alder, når sygdommen opstår og hastigheden, hvormed fæstetabet forløber, inddeles marginal parodontitis i fem undergrupper: præpubertal parodontitis, juvenil parodontitis, hurtigt progredierende voksen parodontitis, langsomt progredierende voksen parodontitis samt akut nekrotiserende parodontitis. Præpubertal og nekrotiserende parodontitis forekommer sjældnest. Den præpubertale parodontitis ses hos børn i det primære tandsæt, og den nekrotiserende parodontitis er i den vestlige verden kendt hos voksne som den alvorligste parodontitis-form med lokal vævsnekrose. De øvrige tre typer er langt de hyppigst forekommende, og derfor inkluderet i nærværende undersøgelse. Ved juvenil parodontitis (JP) og hurtigt progredierende voksen parodontitis (RPP) forløber fæstetabet hurtigt. Knogledefekterne er ofte vertikale, og der ses hyppigt en dårlig sammenhæng mellem plakmængde og sygdomsaktivitet. JP ses hos unge i puberteten, primært omkring 1. molarer og incisiver, mens RPP som regel ses hos unge i 20-30-årsalderen og involverer flere tænder uden noget bestemt mønster. Langsomt progredierende voksen parodontitis (AP) er den hyppigste af alle typerne, og modsat de to senest beskrevne forløber fæstetabet hos disse patienter langsomt. Sygdommen ses som regel først efter 40-årsalderen. Knogledefekterne er ofte horisontale, ligesom der er god korrelation mellem lokale ætiologiske faktorer og sygdomsaktiviteten.

Som det fremgår af ovenstående, kan bakterier medvirke til

nedbrydningen af de parodontale væv ved at påvirke lokale celler i vævet til at danne vævsnedbrydende enzymer. Det er således i dag muligt at identificere elementer af fem forskellige reaktionskæder, ad hvilke nedbrydningen af de parodontale væv kan finde sted:

1. Matriksmetalloproteinaseafhængig vævsnedbrydning.
2. Plasminogenafhængig vævsnedbrydning.
3. PMN-serin-proteinaseafhængig vævsnedbrydning.
4. Fagocytose.
5. Osteoklastisk knogleresorption.

De under punkterne 1-4 nævnte reaktionskæder kan medføre nedbrydning af samtlige komponenter i bindevæv og basalmembraner, mens mineraliseret væv som knogle disintegreres ad den osteoklastiske vej. Nærværende undersøgelse fokuserer på den under punkt 1 nævnte reaktionskæde: matriksmetalloproteinaser og deres mulige betydning for nedbrydningen af det parodontale bindevæv ved marginal parodontitis.

### Matriksmetalloproteinaser

Matriksmetalloproteinaser er en gruppe vævsnedbrydende enzymer, der dannes af mange forskellige celler, bl.a. fibroblasten. På den ene side er fibroblasten ansvarlig for dannelsen af de parodontale bindevæv (gingivalt bindevæv og parodontalligament), men på den anden side secernerer fibroblasten også enzymer som matriksmetalloproteinaser, der som samlet gruppe kan nedbryde samtlige enkeltkomponenter i de parodontale bindevæv.

Der er til dato identificeret 13 enzymer tilhørende gruppen af matriksmetalloproteinaser (Tabel 1) fordelt på: tre kollagenaser, to gelatinaser og fem stromelysiner, der alle virker ekstracellulært på bindevævs komponenter. De seneste år er der desuden identificeret tre typer membranbundne metalloproteinaser. At de er membranbundne indebærer, at de er virksomme på overfladen af cellerne, og data tyder på, at de deltager i aktivering af andre metalloproteinaser. Enzymernes substratspecificitet er forskellig, ligesom de har forskellig molekylvægt (M.), og de er nummereret fra 1-16.

Tidligere undersøgelser har vist, at gingivalekssudatet er rigt på metalloproteinaseaktivitet. Enzymerne stammer især fra neutrofile granulocytter, og mængden af enzymer i gingivalekssudatet er større, jo mere inflammatorisk gingiva er. Dette er i overensstemmelse med den forøgede mængde neutrofile granulocytter, der ses i pochen ved inflammation. I gingiva er celler som makrofager, keratinocytter og fibroblaster indeholdende flere af matriksmetalloproteinaserne tillige påvist.

Både gingiva og parodontalligament er rige på kollagene bindevævsfibre (især type I kollagen), og nedbrydningen af disse fibre vha. matriksmetalloproteinaser formodes derfor at

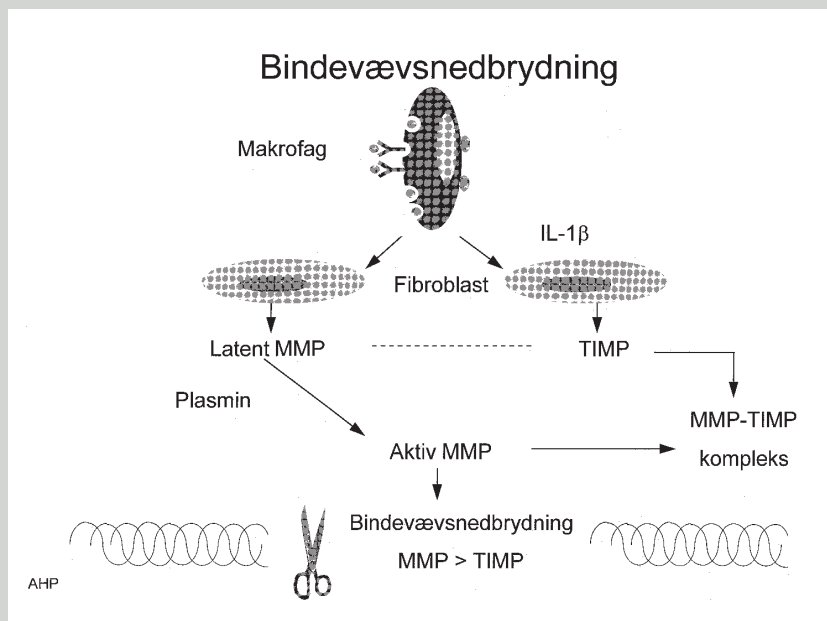
Tabel 1. Familien af matriksmetalloproteinaser (MMP). Opdateret fra Birkedal-Hansen. M.: molekylvægt, PMN: neutrofil granulocyt, PG: proteoglykan.

Enzym	M.	MMP nr.	Substrat
<b>Kollagenase</b>			
Fibroblasttype	52 000	MMP-1	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X
Kollagenase-3	52 000	MMP-13	
PMN-type	75 000	MMP-8	
<b>Gelatinase</b>			
Gelatinase A	72 000	MMP-2	Denatureret kollagen, kollagen IV, V, VII, X, elastin, fibronectin
Gelatinase B	92 000	MMP-9	
<b>Stromelysin</b>			
Stromelysin-1	55 000	MMP-3	PG proteinkæde, fibronectin, laminin, kollagen IV, V, IX, X, elastin
Stromelysin-2	55 000	MMP-10	
Stromelysin-3	61 000	MMP-11	
Metalloelastase	54 000	MMP-12	Elastin
Matrilysin/ PUMP-1	28 000	MMP-7	Fibronectin, laminin, kollagen IV, PG proteinkæde
<b>Membrantype MMP</b>			
MT-MMP-1	63 000	MMP-14	Progelatinase A
MT-MMP-2	72 000	MMP-15	—
MT-MMP-3	64 000	MMP-16	Progelatinase A

være af central betydning i patogenesen ved marginal parodontitis. Det er nærliggende at tænke sig, at forskelle i parodontale fibroblasters evne til at danne matriksmetalloproteinaser, og dermed deres evne til at nedbryde bl.a. de kollagene fibre, kan være et vigtigt supplement til forståelsen af den individuelle sygdomstilbøjelighed.

De molekylære mekanismer, der fører til vævsnedbrydning ved marginal parodontitis, er komplekse og ikke kendt i detaljer, men arbejdsmodeller for de nævnte fem nedbrydningskæder kan skitseres. Arbejdsmodellen for, hvorledes parodontale fibroblaster kan stimuleres til at danne matriksmetalloproteinaser og til efterfølgende at nedbryde bl.a. de kollagene fibre i bindevævet, kan skitseres således (Fig. 1): bakteriebelægninger på tandoverfladen fremkalder en in-

Fig. 1. Arbejdsmodel for bindevævsnedbrydning via matriksmetalloproteinaser. IL-1 $\beta$ : interleukin 1 beta, MMP: matriksmetalloproteinaser, TIMP: vævshæmmere af metalloproteinaser.



flammationsreaktion i gingiva, og inflammationsceller som bl.a. makrofager ophobes lokalt i vævet. Makrofagen har flere funktioner. Den er fagocyterende og antigenpræsenterende, den danner vævsnedbrydende enzymer og frigiver inflammationsmediatorer. Cytokinet interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) er et eksempel på en af disse inflammationsmediatorer. IL-1 $\beta$  stimulerer fibroblasten til bl.a. at danne matriksmetalloproteinaser. Fibroblasten secernerer enzymerne som inaktive molekyler, der ikke direkte kan føre til vævsnedbrydning. Hvis enzymerne imidlertid aktiveres ekstracellulært af andre proteiner som fx plasminogen, som findes i blodbanen, kan vævsnedbrydning finde sted. Vævsnedbrydning er her illustreret ved den molekyllære opbygning af type I kollagen i dets karakteristiske tripelhelix. Systemet er så viseligt indrettet, at en intern kontrolmekanisme er indbygget, således at vævsnedbrydningen ikke løber løbsk, idet fibroblasten samtidigt danner vævshæmmere af metalloproteinaser, hvoraf der til dato er identificeret fire. Matriksmetalloproteinaserne vævsnedbrydende egenskaber hæmmes totalt ved 1:1-bindingen mellem hæmmer og aktiveret matriksmetalloproteinase. Vævsnedbrydning vil i dette simplificerede eksempel finde sted, når mængden af syntetiseret og aktiveret matriksmetalloproteinase overstiger mængden af syntetiseret hæmmer. Fibroblasttypekollagenase (MMP-1) er her formentlig ansvarlig for nedbrydningen af type I kollagen og spalter kollagenmolekylet på et bestemt sted, således at molekylet

deles i to stykker, ét, der svarer til  $\frac{3}{4}$  af den oprindelige længde, og ét, der svarer til  $\frac{1}{4}$ .

Arbejdshypotesen for vores undersøgelse var, at der måtte være en positiv sammenhæng mellem sygdomsaktiviteten ved marginal parodontitis og produktionen af matriksmetalloproteinaser. Celler fra patienter med JP og RPP, hvor fæstetabet forløber hurtigt, måtte således antages at danne større mængder matriksmetalloproteinaser end celler fra patienter med AP, hvor fæstetabet forløber langsomt.

Formålet med undersøgelsen var derfor bl.a. at konstatere, om gingivale fibroblaster fra patienter med forskellige typer marginal parodontitis viste forskelle i deres evne til at producere matriksmetalloproteinaser og dermed til at nedbryde type I kollagen in vitro. Desuden at afdække IL-1 $\beta$ 's modulerende rolle ved denne nedbrydning.

### Egen undersøgelse

#### Materiale og metode

Otteogfyrre personer deltog i undersøgelsen, fordelt på fire grupper: tre grupper med marginal parodontitis tilhørende sygdomskategorierne JP, RPP og AP samt en kontrolgruppe (K) uden tegn på inflammation og fæstetab. Patienterne blev udvalgt og inddelt i grupper på basis af anamnesticke, kliniske og radiologiske registreringer. Patientgruppen med diagnosen JP indeholdt 13 personer i alderen 12-18 år, RPP-gruppen bestod af syv personer i alderen 33-52 år, AP-grup-

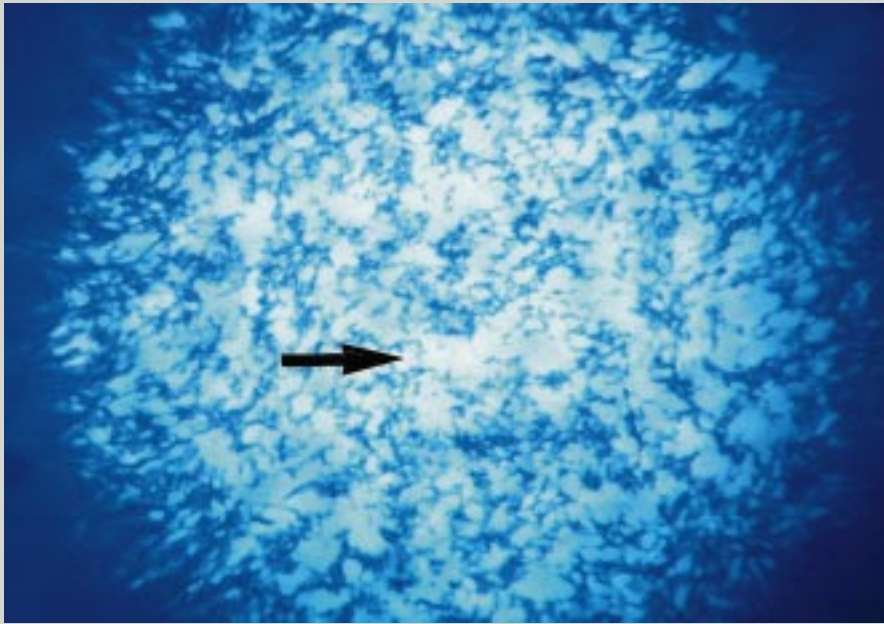


Fig. 2. Stereomikroskopisk optagelse af delvist opløst kollagen i området, hvor cellerne var placeret under inkubering. Fibroblasterne var inkuberet i 72 timer med IL-1 $\beta$  ( $10^{-9}$  M), hvorefter cellerne blev fjernet og resterende kollagen farvet med Coomassie Blue. Perifert ses uopløst kollagen (tæt blå farve). Svarende til området, hvor cellerne var placeret under inkubering, ses perforationer (pil) i kollagenet som tegn på hel eller delvis kollagenedbrydning.

pen af 14 personer i alderen 34-67 år og kontrolgruppen af 14 personer i alderen 20-31 år.

I laboratoriet blev primære gingivale fibroblastkulturer etableret fra gingivalt væv indsamlet fra parodontitis-patienter i forbindelse med parodontalkirurgiske indgreb (modificeret Widman Flap) og fra klinisk inflammationsfrit gingivalt væv fra regio 7,8 $\pm$ 7,8 indsamlet fra kontrolpatienter i forbindelse med amotio af retinerede 8 $\pm$ 8. Deltagelse i undersøgelsen forudsatte således tilladelse til indsamling af eksiceret væv og anvendelse af de heraf etablerede fibroblastkulturer i de efterfølgende in vitro analyser.

Kaskaden illustreret i Fig. 1 kan testes i laboratoriet ved at udså de isolerede fibroblaster på en tynd hinde af type I kollagenfibriller. Fibroblasterne antages at opløse og nedbryde kollagenet i de tilfælde, hvor cellerne secernerer fibroblasttypekollagenase (MMP-1). Tilsættes rekombinant IL-1 $\beta$ , kan effekten af det pågældende cytokin på cellernes evne til kollagenedbrydning desuden analyseres, ligesom tilsætning af plasminogen sikrer aktivering af de secernerede enzymer. Cellerne blev inkuberet ved 37 °C i 95% luft og 5% CO<sub>2</sub> i 24, 48 og 72 timer samt syv dage. Efter endt inkubering blev cellerne fjernet fra kollagenhinden, der blev farvet med Coomassie Blue. Coomassie Blue farver kollagenhinden blå, og opløsning af kollagenhinden ses som områder med manglende farveoptagelse. Det anvendte in vitro assay illustrerer visuelt cellernes funktionelle evne til kollagenedbrydning (Fig. 2).

Grupperne blev sammenlignet med Kruskal Wallis' test inden for de forskellige stimuleringsforhold og inkuberingstider. Kruskal Wallis' *multiple comparison test* blev efterfølgende anvendt til at sammenligne kontrolgruppen med hver enkelt parodontitis-gruppe mht. fibroblasternes evne til type I kollagenedbrydning. Effekten af at tilsætte IL-1 $\beta$  og plasminogen blev statistisk analyseret med sign test. Signifikansniveauet blev sat til 0,05.

### Resultater

Fibroblasternes evne til kollagenedbrydning blev udtrykt ved den større eller mindre mængde kollagen, der resterede ved forsøgenes afslutning (Fig. 3). Kruskal Wallis' test viste, at der var signifikant forskel på gruppernes evne til kollagenedbrydning for celler inkuberet ustimuleret i 24 timer ( $P=0,018$ ), 72 timer ( $P=0,030$ ) og syv dage ( $P=0,017$ ). En nærmere analyse (Kruskal Wallis' *multiple comparison test*) viste, at forskellen fandtes på kontrolgruppen og parodontitis-gruppe JP og AP. Efter 72 timers og efter syv dages inkubering var forskellen at finde på kontrolgruppen og sygdomsgruppen JP. Der var ingen signifikant forskel på grupperne efter 48 timers ustimuleret inkubering (Fig. 3A).

For IL-1 $\beta$ -stimulerede celler var der signifikant forskel på gruppernes evne til kollagenedbrydning efter 24 timers ( $P=0,043$ ), 48 timers ( $P=0,041$ ) og efter 72 timers ( $P=0,024$ ) inkubering. Forskellen fandtes på kontrolgruppen og parodontitis-gruppe JP og AP. Efter 72 timers og efter syv dages inkubering var forskellen at finde på kontrolgruppen og sygdomsgruppen JP. Der var ingen signifikant forskel på grupperne efter 48 timers ustimuleret inkubering (Fig. 3A).

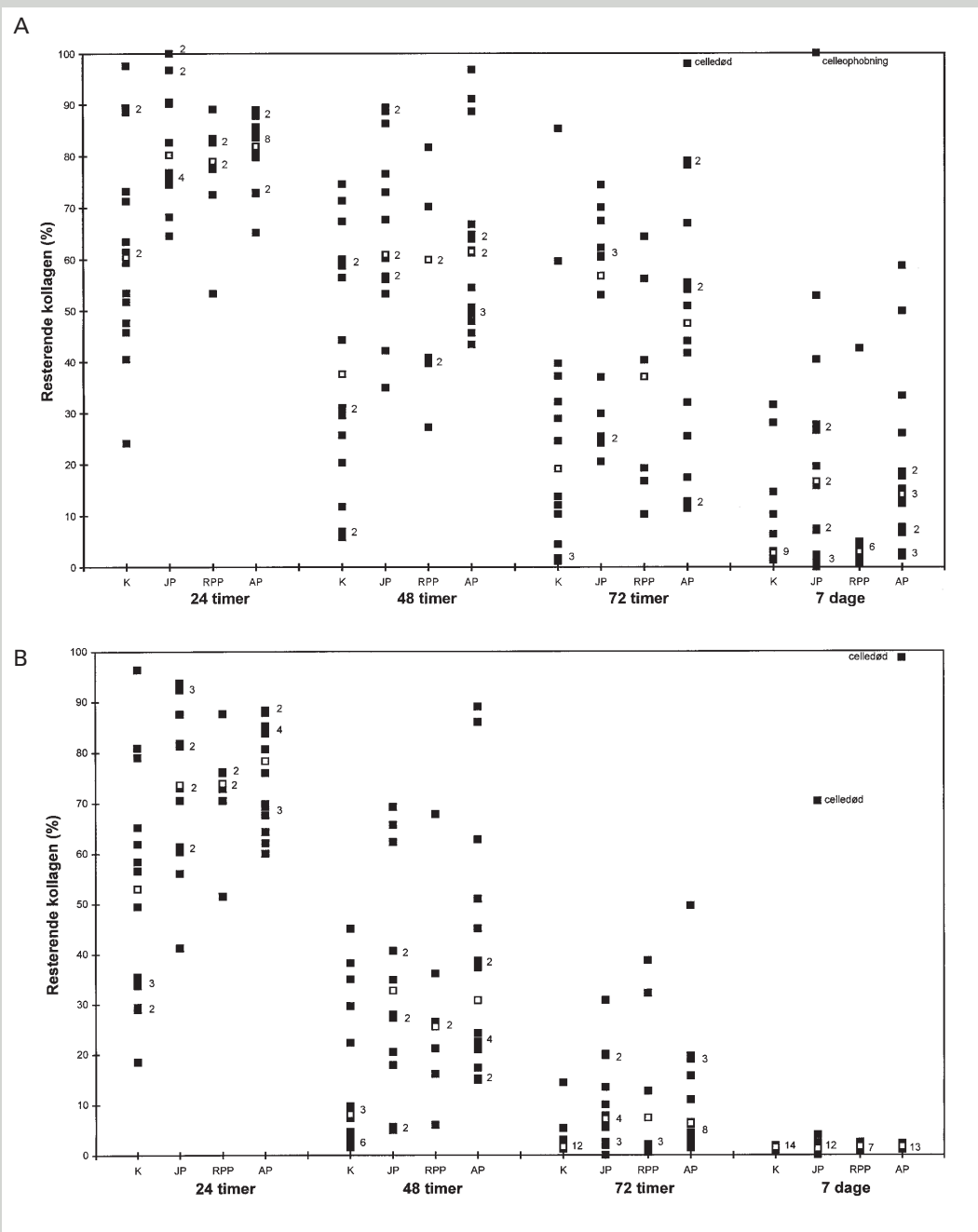


Fig. 3. Mængden af uopløst kollagen (i procent), der resterende i området under cellerne som funktion af inkuberingstid fordelt på grupperne K: kontrolgruppen, JP: juvenil parodontitis, RPP: hurtigt progredierende voksen parodontitis, AP: langsomt progredierende voksen parodontitis. Den procentvise mængde kollagen, der resterende ved forsøgenes afslutning, blev anvendt som et indirekte mål for de enkelte fibroblastkulturers evne til kollagen nedbrydning. A: celler inkuberet ustimeret, dvs. uden tilsetning af cytokin og/eller aktivator. B: celler inkuberet med  $10^{-9}$  M IL-1 $\beta$ . Hvert punkt repræsenterer værdien for en patient, medmindre andet er angivet. □: median.



dontitis-gruppe JP og AP. Der var ingen signifikant forskel på grupperne efter syv dages inkubering (Fig. 3B).

Tilsætning af IL-1 $\beta$ -stimulerede celler fra hele undersøgelsespopulationen til øget kollagenbrydning i forhold til celler inkuberet ustimuleret. I langt de fleste tilfælde gjaldt dette også inden for de enkelte grupper. Tilsætningen af plasminogen havde ingen effekt på kollagenbrydningen målt i området under cellerne.

## Konklusion

Undersøgelsen viste, at gingivale fibroblaster fra patienter tilhørende sygdomsgrupperne JP og AP generelt havde et signifikant lavere potentiale for kollagenbrydning end kontrolgruppen, samt at IL-1 $\beta$  stimulerede cellerne til kollagenbrydning, men at plasminogen ikke ændrede graden af kollagenbrydning. Resultaterne er grafisk illustreret for to af i alt seks forskellige stimuleringsforhold. For de øvrige fire stimuleringsforhold er det vigtigt at nævne, at resultaterne generelt fulgte det samme mønster, således at fibroblaster fra patienter tilhørende kontrolgruppen, uafhængig af stimuleringsstype og inkuberingstid, viste den største grad af kollagenbrydning af alle grupperne. Manglende signifikant forskel på kontrolgruppen og gruppen RPP skyldes muligvis, at gruppen RPP kun indeholdt syv personer, og at et større antal patienter er nødvendigt pga. variationen i resultaterne inden for de enkelte grupper.

De opnåede resultater er således overraskende og i strid med den oprindelige hypotese om, at jo mere sygdomsaktivitet, der var i vævet, hvorfra cellerne kom, des bedre måtte cellerne være til kollagenbrydning. Det er dog ikke givet, at resultater opnået in vitro kan sidestilles med forholdene in vivo. Det anvendte in vitro assay udelukker således øvrige påvirkninger, som cellerne er udsat for in vivo, og betydningen heraf ikke kendt i detaljer. De komplekse molekyllære interaktioner, der in vivo menes at finde sted, kan på nuværende tidspunkt ikke etableres in vitro.

En anden forklaringsmodel kunne være forskelle i cellernes sekretion af vævshæmmere af metalloproteinaser, således at et lavere potentiale for kollagenbrydning kan skyldes cellernes bedre evne til at danne hæmmer og ikke en ringere evne til at danne matriksmetalloproteinaser eller til at aktivere de latente enzymer. Endelig har nyere undersøgelser vist, at matriksmetalloproteinaseres vævsnedbrydende egenskaber kan medvirke i positiv retning i forbindelse med heling af hudsår ved formentlig at nedbryde og dermed fjerne beskadiget væv, inden nyt væv kan dannes.

Undersøgelsens resultater har ført til en revurdering af den oprindelige arbejdshypotese. En revideret arbejdshypotese for betydningen af matriksmetalloproteinaser kunne således

være, at disse enzymer ved marginal parodontitis ikke kun har betydning for den vævsnedbrydende proces. Lokal vævsnedbrydning er muligvis snarere resultatet af en ubalance mellem lokale cellers evne til at fremkalde vævsnedbrydning og til at afstedkomme hurtig vævsheling, begge processer, der formentlig sker under medvirken af metalloproteinaser. Det kan derfor tænkes, at fibroblaster fra patienter med marginal parodontitis har en genetisk eller erhvervet defekt i deres evne til at opretholde en sådan naturlig balance mellem vævsnedbrydning og vævsheling. Den reviderede arbejdshypotese kræver supplerende undersøgelser, men den bringer os forhåbentlig nærmere en forståelse af, hvorfor nogle udvikler fæstetab og andre ikke.

*Havemose Poulsen A. Marginal parodontitis og matrix metalloproteinaser. (ph.d.-afhandling). København: Tandlægeskolen, 1995.*

Afhandlingen er udgæet fra Afdeling for Parodontologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet. Vejledere på ph.d.-afhandlingen har været professor, dr.odont. *Palle Holmstrup* (Afdeling for Parodontologi), lektor, dr.odont. *Dennis Moe* (Afdeling for Odontologisk Biokemi og Mikrobiologi), begge Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, samt professor, dr.odont. *Henning Birke-dal-Hansen* (National Institute of Dental Research, Bethesda, MD, USA). Arbejdet er udført under min ansættelse som kandidatstipendiat på Afdeling for Parodontologi i årene 1992-1995.

Afhandlingen, der er på 129 sider, kan fås på Afdeling for Parodontologi, Tandlægeskolen, Nørre Allé 20, 2200 København N, mod betaling af fremstillingsomkostninger kr. 175.

Forsvaret – i form af ph.d.-forelæsningen med titlen: »Marginal parodontitis og matrix metalloproteinaser« – fandt sted den 26. marts 1996 på Panum Institutet. Medlemmer af bedømmelsesudvalget var professor, dr.med. *Søren Mogensen* og professor, dr.odont. *Mogens Kilian*, begge Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet, samt professor, dr.odont. *Jesper Reibel*, Afdeling for Oral Patologi og Medicin, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

## Forfatter

Anne Havemose Poulsen, tandlæge, forskningsassistent, ph.d. Afdeling for Parodontologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.