



# Risicofactoren voor adulte parodontitis: polymorfismen in de interleukine-1 genfamilie\*

Interleukine (IL)-1 $\gamma$ , IL-1 $\epsilon$  en IL-1 receptorantagonist (ra) zijn stoffen die een rol spelen bij de regulatie van de ontstekingsreactie in parodontale weefsels. Het doel van dit onderzoek was de distributie van bepaalde genetische variaties in de IL-1 genfamilie te onderzoeken bij patiënten met ernstige parodontitis en bij controlepersonen. Ook werden roken en de aanwezigheid van *Porphyromonas gingivalis* en *Actinobacillus actinomycescomitans* betrokken bij het onderzoek.

DNA van 53 niet-rokers en 52 rokers met ernstige adulte parodontitis en van 53 parodontaal gezonde controlepersonen werd getypeerd voor genetische variatie in de IL-1 genfamilie. De aanwezigheid van *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans* werd bepaald met behulp van de kweektechniek.

Een significante hogere frequentie van het genotype+ (IL-1A\*2+IL-1B\*2+IL-1RN\*2) werd gevonden bij niet-rokende parodontitispatiënten zonder kweekbare *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans* in vergelijking met de controlegroep (42,1% versus 11,3%;  $p = 0,0068$ ; or 5,7, 95% ci: 1,6-19,8). Deze resultaten laten zien dat polymorfismen in het IL-1 genfamilie zijn geassocieerd met ernstige adulte parodontitis en dat deze genetische eigenschap wellicht een risicofactor is voor ernstige parodontitis.

LAINÉ ML, FARRÉ MA, GARCÍA-GONZÁLEZ MA, ET AL. Risicofactoren voor adulte parodontitis: polymorfismen in de interleukine-1 genfamilie. Ned Tijdschr Tandheelkd 2002; 109: 303-306.

## Inleiding

Parodontitis is een multifactoriële, chronische infectieuze ziekte die wordt gekarakteriseerd door afbraak van het bindweefsel en het alveolaire bot. De prevalentie van parodontitis in de westerse wereld bedraagt ongeveer 35% bij volwassen personen. Hiervan heeft 10 tot 15% een ernstige vorm van parodontitis (Brown *et al*, 1989).

Bacteriën zijn essentieel voor het initiëren van een weefselreactie die het immuunsysteem aanzet tot afbraak van het parodontium (Page, 1999). De subgingivale microflora bij parodontitispatiënten is opgebouwd uit vele bacteriesoorten, waarvan slechts een beperkt aantal soorten van belang lijkt te zijn voor progressie van parodontale afbraak (Haffajee en Socransky, 1994). Vooral de Gram-negatieve anaërobe zwart-gepigmenteerde staaf *Porphyromonas gingivalis* en de Gram-negatieve staaf *Actinobacillus actinomycescomitans* zijn geassocieerd met ernstige parodontitis (Haffajee en Socransky, 1994).

Adulte parodontitis is niet één entiteit maar een verzameling van meerdere ziektebeelden elk met een verschillende etiologie, natuurlijke progressie en respons op de behandeling. Voor het ontstaan van parodontitis is tevens aanleg voor de ziekte bij de persoon nodig. De belangrijkste risicofactoren zijn de samenstelling van de subgingivale microflora en de genetische en omgevingsfactoren die de respons van de gastheer modificeren (Page *et al*, 1997). Twee andere bekende risicofactoren voor parodontitis zijn roken en diabetes mellitus (afb. 1) (Bergström, 1989; Collin *et al*, 1998).

Cytokinen zijn glycoproteïnen met een hormoon-

achtige werking. Eén groep van cytokinen wordt de interleukinen genoemd. Interleukine-1 $\epsilon$  (IL-1 $\epsilon$ ) en interleukine-1 $\gamma$  (IL-1 $\gamma$ ) zijn pro-inflammatoire interleukinen die de ontstekingsreactie bevorderen, en zijn belangrijke mediators bij chronische inflammatoire ziekten zoals parodontitis (Dinarello, 1994). De anti-inflammatoire cytokines, zoals de interleukine-1 receptorantagonist (IL-1ra) en de transforming growth factor $\beta$ 1, gaan juist de werking van IL-1 $\epsilon$  en IL-1 $\gamma$  tegen en reguleren zo de ontstekingsreactie. In crevulaire vloeistof en parodontale weefsels van parodontitispatiënten zijn verhoogde concentraties IL-1 gevonden (Ishihara *et al*, 1997). De totale hoeveelheden IL-1 $\gamma$  en IL-1 $\epsilon$  en de IL-1/IL-1ra-ratio correleren met verlies van alveolair bot (Ishihara *et al*, 1997).

De IL-1A, IL-1B en IL-1RN genen bevinden zich op chromosoom 2 en coderen voor respectievelijk IL-1 $\gamma$ , IL-1 $\epsilon$  en IL-1ra. Eerder werd aangetoond dat de hoeveelheden IL-1 $\epsilon$  en IL-1ra die een individu produceert, genetisch zijn bepaald (Pociot *et al*, 1992; Andus *et al*, 1997). Polymorfismen (natuurlijke variaties) in de IL-1B en IL-1RN genen zouden een rol kunnen spelen bij de gevoeligheid voor chronische inflammatoire aandoeningen.

Kornman *et al* (1997) lieten zien dat dragerschap van de minder vaak voorkomende allelen 2 (\*2) van IL-1A en IL-1B genen genetische markers zijn voor de ernst van parodontitis bij volwassenen.

Het doel van dit onderzoek was om de associatie van IL-1A\*2+IL-1B\*2 genotype met adulte parodontitis te bevestigen in een Nederlandse populatie en een verband tussen bepaalde genetische varianten, roken en aanwezigheid van de parodontale pathogenen *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans* te onderzoeken.

M.L. Laine<sup>1</sup>  
M.A. Farré<sup>2</sup>  
M.A. García-González<sup>3</sup>  
L.J. van Dijk<sup>3</sup>  
A.J. Ham<sup>4</sup>  
E.G. Winkel<sup>5</sup>  
J.B.A. Crusius<sup>2</sup>  
J.P. Vandenbroucke<sup>6</sup>  
A.J. van Winkelhoff<sup>1</sup>  
A.S. Peña<sup>2</sup>

## Samenvatting

Trefwoorden:

- Parodontologie
- Microbiologie
- Roken

Uit 'de sectie Klinische Orale Microbiologie van het Academisch Centrum voor Tandheelkunde Amsterdam (ACTA), 'het Laboratorium voor Immunogenetica van de Vrije Universiteit in Amsterdam, 'de Parodontologie Praktijk Groningen, 'de Praktijk voor Parodontologie Rotterdam, 'de Kliniek voor Parodontologie Amsterdam en 'de afdeling Klinische Epidemiologie van de Universiteit Leiden.

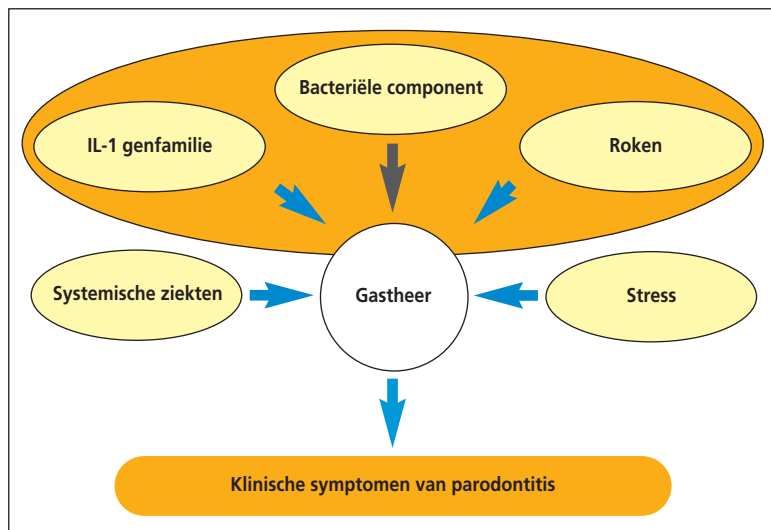
\*Bewerkte vertaling van eerder verschenen publicatie: Laine ML, Farré MA, García-González MA, Dijk LJ van, Ham AJ, Winkel EG, Crusius JBA, Vandenbroucke JP, Winkelhoff AJ van, Peña AS. Polymorphisms of the interleukin-1 gene family, oral microbial pathogens, and smoking in adult periodontitis. *J Dent Res* 2001; 80: 1695-1699. Op 8 februari jl. werd aan dit artikel de Bohn Stafleu Van Loghum-Thoden van Velzenprijs toegekend.

Datum van acceptatie:

27 juni 2002.

Adres:

Mw. dr. M.L. Laine,  
ACTA  
Van der Boechorststraat 7  
1081 BT Amsterdam  
ml.laine.omb.acta@med.vu.nl



Afb. 1. Multifactoriële karakter van parodontitis (modificatie van Page et al, 1997).

### Materiaal en methode

Voor het onderzoek werden 53 niet-rokende (27 vrouwen, 26 mannen) en 52 rokende (27 vrouwen, 25 mannen) volwassen patiënten met ernstige parodontitis en 53 parodontaal gezonde controlepersonen (37 vrouw, 16 man; 44 niet-rokers en 9 rokers) geselecteerd.

Patiënten die rookten of minder dan een jaar geleden waren gestopt met roken, werden beschouwd als rokers. Patiënten die nooit gerookt hadden of meer dan 1 jaar geleden waren gestopt met roken, werden beschouwd als niet-rokers. De proefpersonen waren geen familie van elkaar, waren ouder dan 25 jaar en hadden zowel ouders als grootouders die afkomstig waren uit Nederland. De parodontale status werd vastgesteld op basis van röntgenfoto's en klinisch onderzoek. De pocketdiepte en het klinisch aanhechtingsniveau werden gemeten en met behulp van bitewingopnamen werd het interproximale botverlies bepaald. Patiënten met ernstige parodontitis, dat wil zeggen  $\geq 7$  interproximale sites met  $\geq 50\%$  botverlies, werden geselecteerd. Geen van de controlepersonen had een pocketdiepte  $> 4$  mm of botverlies.

Subgingivale plaquemonsters van 53 niet-rokende en 52 rokende patiënten met ernstige parodontitis werden voor microbiologisch onderzoek verzameld. De diepste pocket in elk kwadrant werd bemonsterd

met een paper-point. Monsters werden geanalyseerd op het voorkomen van *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans*.

DNA van de proefpersonen werd verzameld en geïsoleerd volgens een mondspeelmethode zoals eerder beschreven in Laine et al (2000). In het kort betekent dit dat elke proefpersoon zijn mond gedurende 60 seconden spoelde met 10 ml steriel fysiologische zoutoplossing, die vervolgens werd gecentrifugeerd. De geogste buccale epitheelcellen werden gewassen met een fysiologische zoutoplossing, gekookt, geneutraliseerd en DNA werd uit de cellen geïsoleerd.

Polymorfismen op positie -889 in de promotorregio van het IL-1A gen, op positie +3954 in exon 5 van het IL-1B gen, en een 'variable number of tandem repeat' (VNTR) polymorfisme in het tweede intron van het IL-1RN gen werden vastgesteld met behulp van op de polymerasekettingreacties gebaseerde eerder beschreven methoden (Mansfield et al, 1994; Bioque et al, 1995; McDowell et al, 1995).

De frequenties van het dragerschap van de allelen 2 van de polymorfe IL-1A, IL-1B, en IL-1RN genen bij patiënten met ernstige parodontitis werden vergeleken met de controlegroep (Fisher's exact test 2-zijdig getoetst). Het Hardy-Weinberg-evenwicht werd getest met een  $\chi^2$ -test met 1 df. Een p-waarde  $< 0,05$  werd beschouwd als statistisch significant.

### Resultaten

De gemiddelde leeftijd van de 53 niet-rokende en de 52 rokende volwassen patiënten met ernstige parodontitis en de 53 parodontaal gezonde controlepersonen was respectievelijk 49,0, 44,4 en 40,5 jaar.

Tabel 1 laat de genotype frequenties bij niet-rokende en rokende patiënten met ernstige adulte parodontitis en bij controlepersonen zien. De genotype frequenties van de polymorfismen in IL-1A, IL-1B, en IL-1RN waren in Hardy-Weinberg-evenwicht.

Er werden geen significante verschillen gevonden in de IL-1A, IL-1B, of IL-1RN genotypen, allelen 2-dragerschap en allelfrequenties tussen de 3 onderzochte groepen. Een trend werd gevonden tussen het genotype+ (= IL-1A\*2+IL-1B\*2+IL-1RN\*2 genotype) bij niet-rokende patiënten in vergelijking met de controlegroep (26,4% vs. 11,3%;  $p = 0,08$ ; odds ratio (or) 2,8, 95% confidence interval (ci) 1,0-8,0). Er werd geen significante associatie gevonden in dragerschap van allelen 2 van de IL-1A en IL-1B genen tussen niet-rokende patiënten en controlepersonen (56,6% vs. 41,5%;  $p = 0,17$ ; or 1,83, 95% ci 0,85-3,97), en tussen rokende patiënten en controlepersonen (34,6% vs. 41,5%;  $p = 0,55$ ; or 0,74, 95% ci 0,34-1,64).

De prevalentie van *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans* was vergelijkbaar bij niet-rokende (47,2% en 24,5%) en rokende patiënten (42,3% en 30,8%).

Patiënten werden verdeeld op basis van de aan- of afwezigheid van *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans*. In de groep niet-rokende parodontitispatiënten zonder aantoonbare *P.gingivalis* werd significant vaker

Tabel 1. IL-1A<sup>-889</sup>, IL-1B<sup>+3954</sup>, en IL-1RN (VNTR) genotypen in niet-rokende en rokende parodontitispatiënten en controlepersonen.

	Genotype	Parodontitis niet-rokers (n = 53)	Parodontitis rokers (n = 52)	Controlepersonen (n = 53)
IL-1A <sup>-889</sup>	1.1	16	21	21
	1.2	32	25	24
	2.2	5	6	8
IL-1B <sup>+3954</sup>	1.1	22	32	29
	1.2	29	13	20
	2.2	2	7	4
IL-1RN VNTR	1.1	28	27	32
	1.2	19	19	17
	2.2	4	4	3
	1.3	0	2	1
	2.3	2	0	0

het genotype+ aangetroffen dan in de controlegroep (32,1% vs. 11,3%;  $p = 0,034$ ; or 3,7, 95% ci 1,1-11,9). Ook in de groep *A.actinomycescomitans*-negatieve patiënten bleek de prevalentie van personen met het genotype+ hoger te zijn in vergelijking met de controlegroep (32,5% vs. 11,3%;  $p = 0,018$ ; or 3,8, 95% ci 1,3-11,1).

De hoogste frequentie van het genotype+ werd gevonden bij niet-rokende *P.gingivalis*- en *A.actinomycescomitans*-negatieve patiënten (42,1% vs. 11,3% in de controlegroep,  $p = 0,0068$ ; or 5,7, 95% ci 1,6-19,8) (afb. 2). Dit genotype+ kwam bij andere groepen vrijwel even vaak voor als bij de controlegroep (afb. 2).

## Discussie en conclusie

Een aantal onderzoeken heeft laten zien dat genetische factoren een rol spelen in pathogenese van parodontitis bij volwassenen (Hassell en Harris, 1995; Michalowicz *et al*, 2000). Door onderzoek bij eenenigge en twee-eiige tweelingen is de invloed van genetische factoren in adulte parodontitis duidelijk aangetoond (Michalowicz *et al*, 2000).

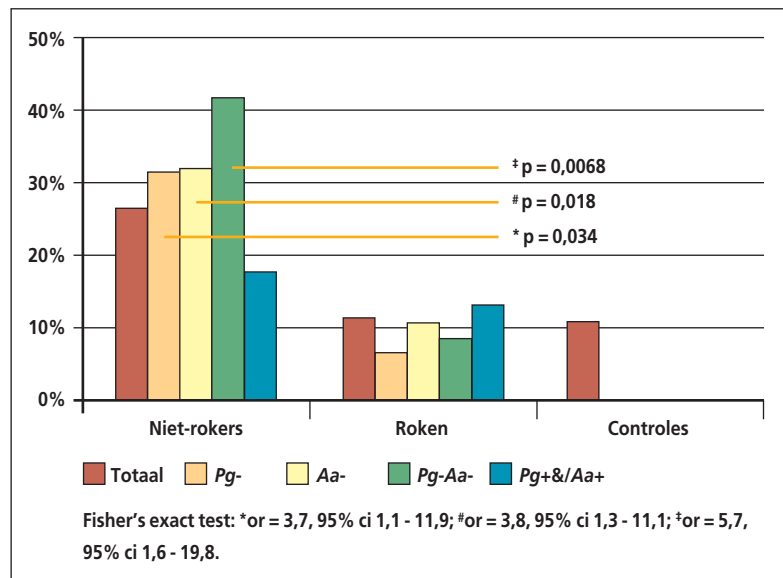
In associatieonderzoeken is polymorfisme in het IL-1A<sup>889</sup> gen in verband gebracht met juveniele artritis. Polymorfisme in het IL-1RN (VNTR) gen is geassocieerd met aandoeningen zoals colitis ulcerosa, systemische lupus erythematoses en een bepaalde vorm van kaalheid.

Kornman *et al* (1997) hebben eerder gesuggereerd dat het samengestelde genotype IL-1A\*2+IL-1B\*2 een risicofactor is voor ernstige adulte parodontitis bij niet-rokers. In het hier beschreven onderzoek konden de waarnemingen van Kornman *et al* niet worden bevestigd (56,6% bij patiënten vs. 41,5% bij controlepersonen). Het aantal patiënten in het onderzoek van Kornman *et al* was klein en er werd geen bacteriologisch onderzoek uitgevoerd.

In het hier beschreven onderzoek is rekening gehouden met de aan- en afwezigheid van twee belangrijke parodontale pathogenen: *P.gingivalis* en *A.actinomycescomitans*, en het rookgedrag van de patiënten. Omdat roken een belangrijke risicofactor is voor parodontitis, werden vooraf patiënten geselecteerd op basis van hun rookgedrag. In de controlegroep werden rokers en niet-rokers apart geanalyseerd, aangezien het niet te verwachten was dat roken geassocieerd is met bepaalde polymorfismen in de IL-1 genfamilie.

Wel werd een associatie gevonden tussen het voorkomen van genotype+ en de niet-rokende patiënten bij wie geen *P.gingivalis* (or 3,7) of *A.actinomycescomitans* (or 3,8) kon worden aangetoond. Interessant was dat de hoogste frequentie van het genotype+ werd gevonden bij de groep patiënten die niet rookten en geen van beide bacteriën hadden (or 5,7). Bij rokende patiënten met parodontitis kwam dit genotype in vergelijkbare frequentie voor als in de controlepersonen zonder parodontitis.

Eerder onderzoek heeft laten zien dat de hoeveelheden IL-1b en IL-1ra die een individu kan produceren, gerelateerd zijn aan polymorfismen in de IL-1B en IL-1RN genen (Pociot *et al*, 1992; Andus *et al*, 1997). Mono-



Afb. 2. Dragenschap frequentie van het genotype+ (IL-1A-889\*2+IL-1B+3954\*2+IL-1RN\*2 VNTR) bij parodontitispatiënten en parodontaal gezonde controlepersonen in relatie tot de microbiële parameters en roken.

Pg- = *P.gingivalis*-negatief; Aa- = *A.actinomycescomitans*-negatief; Pg-Aa- = *P.gingivalis*- en *A.actinomycescomitans*-negatief; Pg + &/Aa+ = *P.gingivalis*- en/of *A.actinomycescomitans*-positief.

cyten van individuen die homozygoot of heterozygoot zijn voor het hier bestudeerde allel 2 van IL-1B<sup>3954</sup> gen produceerden respectievelijk 2 en 4 keer meer IL-1 $\epsilon$  dan de overige individuen. Dragenschap van allel 2 van het IL-1RN VNTR polymorfisme is geassocieerd met lagere productie van IL-1ra. Op basis van deze waarnemingen kan worden verondersteld dat het bezit van genotype+ (IL-1A\*2+IL-1B\*2+IL-1RN\*2) een individu mede kan predisponeren voor adulte parodontitis door overproductie van IL-1 $\epsilon$  en onvoldoende productie van IL-1ra als respons op immuun- en inflammatoire stimuli. De hogere frequentie van het genotype+ bij niet-rokende *P.gingivalis*- en *A.actinomycescomitans*-negatieve patiënten met ernstige adulte parodontitis is een aanwijzing dat deze combinaties van allelen genetische risicofactoren vormen voor adulte parodontitis. Wellicht kan deze informatie in de toekomst een rol spelen bij de diagnose en de behandeling van patiënten met ernstige adulte parodontitis.

## Literatuur

- ANDUS T, DAIG R, VOGL D, ET AL. Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor agonist genotype 2. Gut 1997; 41: 651-657.
- BERGSTRÖM J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. Community Dent Oral Epidemiol 1989; 17: 245-247.
- BIOQUE G, CRUSIUS JBA, KOUTROUBAKIS I, ET AL. Allelic polymorphism in IL-1b and IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) genes in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol 1995; 102: 379-383.
- BROWN LJ, OLIVER RC, LOE H. Periodontal diseases in the U.S. in 1981: prevalence, severity, extent, and role in tooth mortality. J Periodontol 1989; 60: 363-370.
- COLLIN HL, UUSITUPA M, NISKANEN L, ET AL. Periodontal findings in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1998; 69: 962-966.
- DINARELLO CA. The biological properties of interleukin-1. Eur Cytokine Netw 1994; 5: 517-531.

- HAJFAR AD, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
- HASSELL TM, HARRIS EL. Genetic influences in caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6: 319-342.
- ISHIIHARA Y, NISHIHARA T, KUROYANAGI T, ET AL. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontol Res* 1997; 32: 524-529.
- KORNMAN KS, CRANE A, WANG H-Y, ET AL. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 72-77.
- LAINE ML, FARRÉ MA, CRUSIUS JB, WINKELHOFF AJ VAN, PEÑA AS. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000; 71: 1315-1318.
- MANSFIELD JC, HOLDEN H, TARLOW JK, ET AL. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterol* 1994; 106: 637-642.
- MCDOWELL TL, SYMONS JA, PLOSKI R, FØRRE O, DUFF GW. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 221-228.
- MICHALOWICZ BS, DIEHL SR, GUNSOLLEY JC, ET AL. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol* 2000; 71: 1699-1707.
- PAGE RC, OFFENBACHER S, SCHROEDER HE, SEYMOUR GJ, KORNMAN KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 1997; 14: 216-248.
- PAGE RC. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontol Res* 1999; 34: 331-339.
- POCIOT F, MØLVIG J, WOGENSEN L, WORSAAE H, NERUP J. A TaqI polymorphism in the human interleukin-1b (IL-1b) gene correlates system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation with IL-1b secretion *in vitro*. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 396-402.

## Summary

Key words:

- Periodontology
- Microbiology
- Smoking

## Risk factors in adult periodontitis: Polymorphisms in interleukin-1 gene family

Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1 receptor antagonist (ra) play a major role in regulation of the inflammatory response in periodontal tissues. The aim of this study was to investigate the distribution of genetic variation in the IL-1 gene family among periodontitis patients and controls, taking into account smoking and microbiology as additional variables.

There were 53 non-smoking and 52 smoking patients with severe adult periodontitis and 53 periodontal healthy controls genotyped for genetic variation in the IL-1 gene family. The presence of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* was established by culture techniques. A higher frequency of genotype+ (IL-1A\*2+IL-1B\*2+IL-1RN\*2) was found in non-smoking periodontitis patients in whom *P.gingivalis* and *A.actinomycetemcomitans* could not be detected (42.1% vs. 11.3% in controls;  $p = 0.0068$ ; or 5.7, 95% ci: 1.6-19.8). This data provide evidence that polymorphisms in genes of the IL-1 family are associated with severe adult periodontitis and may be a risk factor for severe periodontitis