

# Parodontitis en proteasen? Geen uitgemaakte zaak

**Samenvatting.** Tijdens parodontale ontstekingen sijpelen verschillende stoffen van zowel de gastheer als bacteriële oorsprong naar de gingivale crevulaire vloeistof (GCV) en speeksel. Deze stoffen, zoals eiwitten en peptiden, dienen daardoor als biomarkers van het onstekingsproces. Met behulp van gevoelige en geavanceerde laboratoriumtechnieken is de rol van al deze biomarkers inmiddels in kaart gebracht. Maar de hoge kosten, complexiteit en lastige interpretatie van de gevonden resultaten werken vaak belemmerend voor de implementatie van biomarkers voor diagnostische doeleinden in de tandheelkundige praktijk. Bepaalde speekselenzymen, de proteasen, kunnen fungeren als biomarkers en hebben interessante eigenschappen voor het bedrijven van snelle diagnostiek aan de stoel. De aanwezigheid of activiteit van een protease kan namelijk op een eenvoudige en snelle, biochemische manier worden aangetoond, bijvoorbeeld door kleurverandering. Omdat ook andere processen in de mond van invloed zijn op de testuitslag zijn dergelijke testen vooral bruikbaar als onderdeel van een uitgebreider diagnostisch onderzoek.

Bikker FJ, Kaman-van Zanten WE, Laine ML. Parodontitis en proteasen? Geen uitgemaakte zaak  
Ned Tijdschr Tandheelkd 2019; 126: 385-388  
doi: <https://doi.org/10.5177/ntvt.2019.07/08.19032>

## INLEIDING

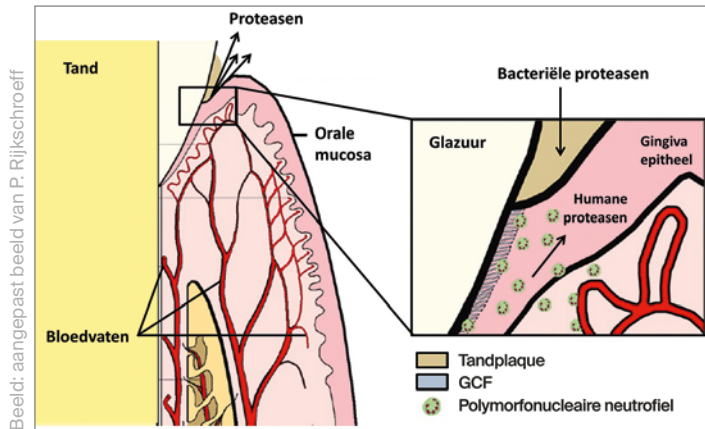
In een gezonde mond bestaat een ecologisch evenwicht tussen micro-organismen en gastheer. Wanneer dat evenwicht wordt verstoord, bijvoorbeeld door onmaatse mondzorg, kunnen pathogene micro-organismen de overhand krijgen. Dit kan vervolgens resulteren in verschillende aandoeningen waaronder cariës, gingivitis, parodontitis en halitose. Voor het verkrijgen van inzicht in het ontstaan van de aandoening of de evaluatie van een behandeling, kan het identificeren en kwantificeren van micro-organismen of ontstekingsmediatoren een belangrijke bijdrage aan tandheelkundige zorg leveren. Idealiter zouden deze testen direct aan de stoel gebruikt kunnen worden, bij voorkeur nog voordat er klinische verschijnselen optreden. Veel huidige methoden van microbiologische en biochemische (vroeg)diagnostiek zijn hiervoor echter niet geschikt. Voor zowel de uitvoering van de analyse als voor de interpretatie van de uitslag zijn namelijk specifieke apparatuur en expertise nodig. Verder kan het dagen tot zelfs weken duren voordat een uitslag bekend is. In dit perspec-

tief kan, in specifieke gevallen, een snelle, goedkope en simpel uitvoerbare diagnostische test de doelmatigheid van de verleende mondzorg verbeteren.

## SPEEKSELBIOMARKERS VOOR PARODONTITIS

Doordat speeksel veilig en eenvoudig is te verzamelen, is het een aantrekkelijke vloeistof die kan helpen bij vroegdiagnostiek. Bij parodontale ontstekingen bijvoorbeeld sijpelen er verschillende stoffen van zowel de gastheer als van bacteriologische oorsprong van het ontstoken parodontale weefsel naar de gingivale crevulaire vloeistof (GCV) en speeksel (afb. 1). Deze stoffen, zoals ontstekingsmediatoren, enzymen en peptiden kunnen daardoor dienen als moleculaire verklikkers ofwel biomarkers, van het ontstekingsproces. Ook kunnen in geval van bloedingen stoffen zoals albumine en hemoglobine in de mond terecht komen. Deze eiwitten horen in een gezonde mond niet thuis en dienen daardoor ook als biomarker voor parodontitis (Giannobile, 2012; Ebersole et al, 2013).

De afgelopen jaren heeft het onderzoek naar paro-



Beeld: aangepast beeld van P. Rijkschroeff

**Afb. 1.** Bacteriële en humane proteasen sijpelen naar de gingivale creviculaire vloeistof (GCV) en speeksel.

dontale biomarkers een vlucht genomen. Met behulp van gevoelige en geavanceerde technologieën, zoals massaspectrometrische technieken en biochemische testen, zijn er verschillende onderzoeken gedaan met als doel het totale parodontale inflammatoom (een verzamelnaam voor alle betrokken biomarkers in geval van een parodontale ontsteking) te ontrafelen. Afhankelijk van de gebruikte laboratoriummethodologie en analyses varieert het aantal en de soort van de parodontale biomarkers sterk: van een paar dozijn tot enkele honderden (Baliban et al, 2012; Prodan et al, 2015; Lira-Junior et al, 2017; Bostanci en Belibasakis, 2018).

Hoewel met deze uitgebreide analyses in GCV en speeksel de verschillende immunologische processen van parodontale ontstekingen goed in kaart zijn te brengen, zijn de kosten, complexiteit van deze analyses en de lastige interpretatie van de onderzoeksresultaten een belemmering voor de praktische implementatie voor diagnostiek in de tandheelkundige praktijk. Eén bepaalde klasse enzymen, de proteasen, vormt hierop echter een uitzondering en kan de sprong naar een aanvullende test voor parodontale screening in de praktijk wél maken.

## PROTEASEN

Proteasen breken eiwitten af door het splitsen van de verbinding tussen 2 aminozuren in een eiwitketen. In algemene zin spelen proteasen een rol in tal van biologische processen waaronder groei, ontwikkeling en afweer. Binnen de mondgezondheid spelen tientallen proteasen, van zowel bacteriële als humane herkomst, een belangrijke rol in een aantal aandoeningen. Voorbeelden hiervan zijn halitose, gingivitis en parodontitis.

Het parodontale proteasoom (het totale pakket proteasen die een rol spelen bij parodontitis) is zeer complex en betrokken bij een groot aantal moleculaire processen (Ebersole et al, 2013; Bostanci et al, 2018). Voorbeelden van bacteriële proteasen die een rol spelen bij parodonti-

tis zijn karilysinen, dentilysinen en gingipainen. Deze proteasen zijn respectievelijk afkomstig van de zogenoemde 'rode-complex'-bacteriën *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* en *Porphyromonas gingivalis*. De aanwezigheid en activiteit van deze proteasen leidt onder andere tot de afbraak van orale weefsels zoals collageen, wat kan leiden tot verlies van parodontale ligament en uiteindelijk van gebitselementen. Ook dragen proteasen bij aan de vorming van plaque en de ontmanteling van de natuurlijke afweer (Potempa en Pike, 2009). Als reactie hierop lanceert de gastheer op zijn beurt een verscheidenheid aan afweermechanismen. Een van deze afweermechanismen betreft de aanmaak van gastheerproteasen, de zogenoemde matrix metalloproteasen (MMPs) die een bijdrage leveren aan afweer en herstel (Sorsa et al, 2004).

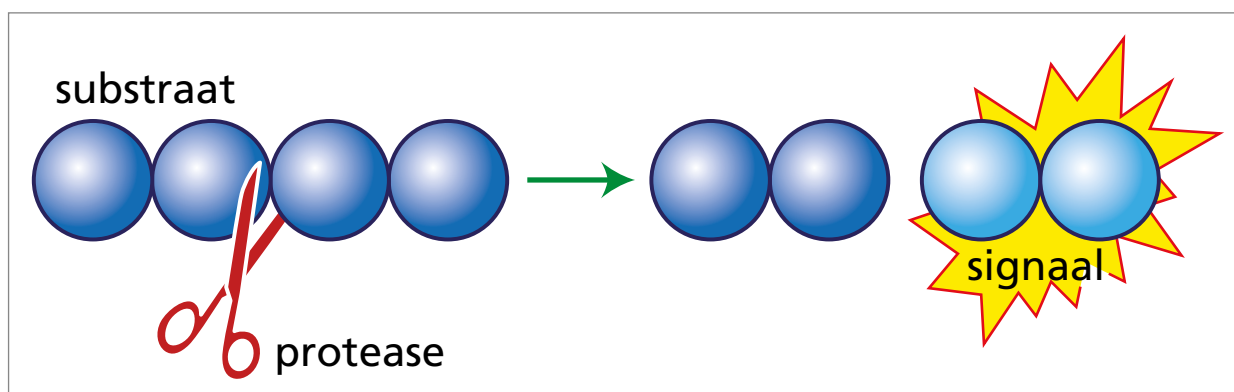
## EERSTE BACTERIËLE SPEEKSEL-PROTEASE TEST

Zoals hierboven reeds aangegeven hebben proteasen interessante eigenschappen voor het ontwikkelen van snelle aanvullende diagnostische methoden en testen. Ze verbreken namelijk in korte tijd (seconden tot minuten) de verbinding tussen 2 aminozuren in een eiwit of peptide, het substraat van de protease. Het verloop van de enzymatische splitsing kan met behulp van verschillende biochemische technieken, bijvoorbeeld door kleurverandering of het ontstaan van fluorescentie worden aangetoond (afb. 2).

In 1990 werd een eerste, voor in de praktijk bruikbare methode ontwikkeld waarmee door middel van een kleuromslag de aanwezigheid van bepaalde bacteriële proteasen in speeksel kon worden aangetoond. Deze methode staat bekend als de BANA-test (OraTec Corporation) en maakt gebruik van het proteasesubstraat benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) (Loesche et al, 1990). De BANA-test was initieel ontwikkeld voor het aantonen van proteasen afkomstig van de 'rode-complex' bacteriën. Echter, de BANA-test bleek ook gevoelig voor afbraak door humane proteasen. Bovendien bleek het kleursignaal van dit proteasesubstraat vaak laag, wat leidde tot een lage sensitiviteit en specificiteit. Mede hierdoor heeft de BANA-test binnen de tandheelkunde geen hoge vlucht genomen.

## GESPIEGELDE AMINOZUREN VOOR HOGERE BACTERIËLE SPECIFICITEIT

Ondanks de enorme complexiteit van het totale parodontale proteasoom, spelen in veel gevallen de proteasen van *P. gingivalis*, de gingipainen, een duidelijk herkenbare rol. Onderzoeken hebben namelijk aangetoond dat het gehalte aan gingipainen kan oplopen tot 85% van het totale parodontale proteasoom (Guentsch et al, 2013). Om deze reden zijn een aantal jaar geleden synthetische *P. gingivalis*-specifieke proteasesubstraten ontwikkeld. Kenmerkend



Beeld: Frans Hessels

**Afb. 2.** Een schematische weergave van een protease-substraatinteractie. Wanneer een protease het substraat knipt, valt het in brokstukken uiteen. De aanwezigheid van een afgebroken substraat kan voor een diagnostische methode, zoals de BANA-test, zichtbaar worden gemaakt.

voor deze substraten is de aanwezigheid van 'gespiegelde' aminozuren (afb. 3) die specifiek door bacteriële proteasen worden herkend (Galassi et al, 2012; Kaman et al, 2012). Door de aanwezigheid van deze gespiegelde aminozuren kon de substraat-specificiteit voor *P. gingivalis* worden verhoogd tot bijna 100%. Ter vergelijking: de specificiteit van de BANA-test was in hetzelfde onderzoek 85%. Daarnaast bleek de sensitiviteit van de nieuwe *P. gingivalis*-substraten 60-75% terwijl de sensitiviteit van de BANA-test op 40% uitkwam. Kortom, door gebruik te maken van gespiegelde aminozuren is een duidelijke verbetering gemaakt ten aanzien van specificiteit en sensitiviteit van proteasesubstraten voor diagnostiek. Op dit moment wordt er gewerkt aan een prototype handzame test op basis substraten met gespiegelde aminozuren (Alhogail et al, 2018). Een commerciële test, op basis van gespiegelde aminozuren, is op dit moment nog niet verkrijgbaar.

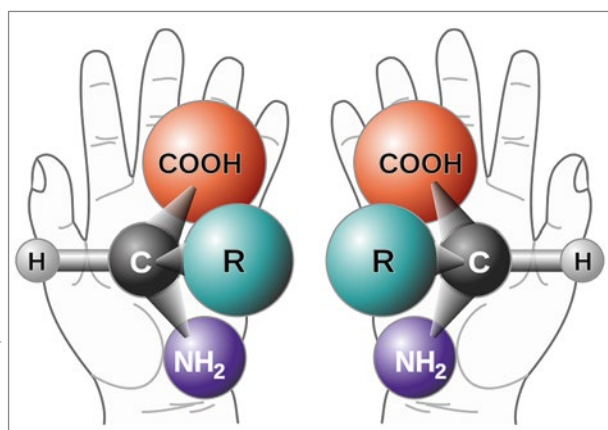
### ANALYSE VAN HUMAAN MMP-8

Een recentelijk geïntroduceerde, handzame test, die wel verkrijgbaar is en is gebaseerd op de detectie van de actieve vorm van het humane protease MMP-8 (aMMP-8), betreft de Periosafe-test (PerioSafe™). In tegenstelling tot de BANA-test en de methode met de gespiegelde protease-substraten meet de Periosafe geen protease-activiteit, maar het gehalte aMMP-8 in GCV en speeksel. Het gebruik er-

van is eenvoudig: GCV, speeksel of mondspoelsel wordt bij een patiënt afgenomen en op een teststrookje aangebracht. Na 5 minuten wordt zichtbaar of het gehalte aMMP-8 boven een bepaalde drempelwaarde ligt; ter illustratie vergelijkbaar met het uitlezen van een zwangerschapstest. Dit maakt deze test in principe geschikt voor screeningdoel-einden of ondersteunend diagnostisch onderzoek. Echter, ondanks het gebruiksgemak en de snelheid is de uitslag van de Periosafe-test indicatief; uit onderzoek blijkt dat de gevonden specificiteit en sensitiviteit variëren afhankelijk van de gekozen klinische set-up. Volgens de ontwikkelaars bereikt de Periosafe een specificiteit van 97% en een sensitiviteit van 83%; in de praktijk leiden deze waarden alsnog tot een vals-positief gestelde diagnose van ongeveer 40% (Mäntylä et al, 2003, Heikkinen et al, 2016, Gosse-link, 2016). Verder moet worden opgemerkt dat aMMP-8 niet specifiek is voor parodontale ontstekingen, aangezien MMP-8 ook betrokken is bij diverse andere fysiologische en infectiegerelateerde processen binnen en buiten de mondholte (Dejonckheere et al, 2011). MMP-8-gehalten blijken bijvoorbeeld ook verhoogd in geval van cariës, gingivitis en peri-implantitis, wat een passende uitspraak op basis van deze test alléén lastig maakt (Hedenbjork-Lager et al, 2015; Thierbach et al, 2016; Nascimento et al, 2019).

### TOT SLOT

Recente klinische onderzoeken tonen aan dat het meten van de totale proteolytische activiteit in speeksel mogelijk een betere voorspellende kwalitatieve waarde heeft dan het meten van alleen bacteriële of humane proteasen (Bikker et al, 2019; Verhulst et al, 2019). Namelijk, de oorsprong, samenstelling en interactie tussen de proteasen onderling, in combinatie met de aanwezigheid van remmers en stimulators, dragen bij aan het ontstaan van de totale proteolytische activiteit. In dit licht is dus het meten van de totale protease-activiteit een logisch uitgangspunt. Deze test is eenvoudig en snel uit te voeren bij een patiënt. Omdat ook andere processen in de mond van invloed zijn op de uitslag van de test moet de uitslag van deze test, en alle bovengenoemde proteasetesten, worden gezien als aanvullend onderdeel van een uitgebreid diagnostisch onderzoek.



Beeld: Wikipedia

**Afb. 3.** De links- en rechtshandige vorm van het aminozuur alanine zijn optische isomeren (elkaars spiegelbeelden).

## LITERATUUR

- \* *Alhogail S, Suaifan GARY, Bizzarro S, et al.* On site visual detection of Porphyromonas gingivalis related periodontitis by using a magnetic-nanobead based assay for gingipains protease biomarkers. *Microchim Acta* 2018; 185:149.
- \* *Baliban RC, Sakellari D, Li Z, DiMaggio PA, Garcia BA, Floudas CA.* Novel protein identification methods for biomarker discovery via a proteomic analysis of periodontally healthy and diseased gingival crevicular fluid samples. *J Clin Periodontol* 2012; 39: 203-212.
- \* *Bikker FJ, Nascimento GG, Nazmi K, et al.* Salivary total protease activity as predictor of induction and resolution of gingival inflammation. *Mol diagn ther* 2019; submitted.
- \* *Bostanci N, Bellibasakis GN.* Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontol* 2000 2018; 76: 68-84.
- \* *Bostanci N, Selevsek N, Wolski W, et al.* Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. *Mol Cell Proteomics* 2018; 17: 1392-1409.
- \* *Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C.* Matrix metalloproteinase-8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 73-81.
- \* *Ebersole JL, Schuster JL, Stevens J, et al.* Patterns of salivary analytes provide diagnostic capacity for distinguishing chronic adult periodontitis from health. *J Clin Immunol* 2013; 33: 271-279.
- \* *Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, et al.* Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of Porphyromonas gingivalis in patients with or without peri-implant infections. *J Periodontal Res* 2012; 47: 616-625.
- \* *Giannobile WV.* Salivary diagnostics for periodontal diseases. *J Am Dent Assoc* 2012; 143: 6S-11S.
- \* *Guentsch A, Hirsch C, Pfister W, et al.* Cleavage of IgG1 in gingival crevicular fluid is associated with the presence of Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res* 2013; 48: 458-465.
- \* *Gosselink K.* Periosafe meet parodontale afbraak. Paropreventie met een strookje. *Nederlands Tandartsenblad* 2016; 71: 20-23.
- \* *Hedenbjork-Lager A, Bjorndal L, Gustafsson A, et al.* Caries correlates strongly to salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res* 2015; 49: 1-8.
- \* *Heikkinen AM, Nwhator SO, Rathnayake N, et al.* Pilot study on oral health status as assessed by an active matrix metalloproteinase-8 chairside mouthrinse test in adolescents. *J Periodontol* 2016; 87: 36-40.
- \* *Kaman WE, Galassi F, de Soet JJ, et al.* Highly specific protease-based approach for detection of Porphyromonas gingivalis in diagnosis of periodontitis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 104-112.
- \* *Lira-Junior R, Ozturk VO, Emingil G, Bostanci N, Bostrom EA.* Salivary and serum markers related to innate immunity in generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2017; 88: 1339-1347.
- \* *Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, et al.* Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1551-1559.
- \* *Mäntylä P, Stenman M, Kinane DF, et al.* Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res* 2003; 38: 436-439.
- \* *Nascimento GG, Baelum V, Sorsa T, Tervahartiala T, Skottrup PD, Lopez R.* Salivary levels of MPO, MMP-8 and TIMP-1 are associated with gingival inflammation response patterns during experimental gingivitis. *Cytokine*. 2019; 115: 135-141.
- \* *Potempa J, Pike RN.* Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun* 2009; 1: 70-87.
- \* *Prodan A, Brand HS, Ligtenberg AJ, et al.* Interindividual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. *Eur J Oral Sci* 2015; 123: 149-157.
- \* *Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T.* Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis* 2004; 10: 311-318.
- \* *Thierbach R, Maier K, Sorsa T, Mantyla P.* Peri-Implant sulcus fluid (PISF) matrix metalloproteinase (MMP) -8 levels in peri-implantitis. *J Clin Diagn Res* 2016; 10: ZC34-38.
- \* *Verhulst M, Teeuw WJ, Bizzarro S, et al.* A rapid, non-invasive tool for periodontitis screening in a medical care setting. *BMC Oral Health* 2019; 19: 87.

## SUMMARY

**Periodontitis and proteases. Hardly a closed case**

*During periodontal inflammation, a multitude of substances both from the host and of microbiological origin are released into the gingival crevicular fluid (GCV) and saliva. These substances, such as proteins and peptides, can therefore be regarded as biomarkers of the inflammatory process. With the help of sensitive and advanced laboratory technologies, the role of these biomarkers has been identified. However, the high costs, complexity and difficulty of interpretation of the results often hinder the introduction of biomarkers for diagnostic purposes in the dental practice. Certain salivary enzymes, proteases, can function as biomarkers and have interesting properties for producing rapid chairside diagnoses, because the presence of a protease or proteolytic activity can be demonstrated in a simple and rapid biochemical way, for example by colour signalling. Since other processes in the oral cavity influence the results of the test, such tests are especially useful as one element in a broader oral diagnostic investigation.*

## BRON

F.J. Bikker<sup>1</sup>, W.E. Kaman-van Zanten<sup>1</sup>, M.L. Laine<sup>2</sup>

Uit de afdelingen <sup>1</sup>Orale Biochemie <sup>2</sup>Parodontologie van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA)

Datum van acceptatie: 27 mei 2019

Adres: dr. F.J. Bikker, ACTA, Gustav Mahlerlaan 3004, 1081 LA Amsterdam  
f.bikker@acta.nl