

**STEFAN RÜDIGER**, odont lic, övertandläkare i parodontologi, Folk tandvården Skåne, Specialistkliniken för parodontologi och endodonti, Malmö.

## Plasmaproteiners betydelse för adhesion av bakterier på tandytor

⦿ Den 9 maj 2003 försvarade tandläkare Stefan Rüdiger sin vetenskapliga uppsats *"On the Role of Plasma Proteins in Bacterial Adhesion to Dental Surfaces"* vid Odontologiska fakulteten, Göteborgs universitet.

Syftet med avhandlingen var att undersöka om plasmaproteiner förekommer i pellicel på tandytor och där kan fungera som receptorer för bindning av framför allt bakterier associerade med gingivit och parodontit till tandytan.

Examinator var professor Gunnar Dahlén, avdelningen för Oral mikrobiologi, Göteborg.Handledare för arbetet har varit professor Jan Olsson och fil dr Anette Carlén.

### **AUTOREFERAT**

GODKÄNT FÖR PUBLICERING 5 SEPTEMBER 2003

**B**akterier i plack måste vara förankrade på tandytan för att motstå krafter från till exempel salivflöde och rörelser av kind och tunga. Vidhäftning fås genom bindning mellan specifika strukturer på bakteriens yta (adhesiner) och proteiner i pellikeln (receptorer) på tandytan (figur 1). Bakterier associerade med parodontal sjukdom kan binda till både saliv- och plasmaproteiner. Salivens roll i pellikel- och plackbildning har studerats ingående. Gingivalvätskans betydelse i detta sammanhang har emellertid endast sparsamt undersökts. I tidigare studier av pellikelbildning *in vivo* har ofta använts konstgjorda material. Dessa har som regel applicerats på ett sätt som inte tillåtit kontakt med gingivalvätska. En tandyta *in situ* utsätts emellertid även för gingivalvätska.

Bakteriekolonisation och plackbildningshastighet ökar vid tandköttinflammation och det har spekulerats i om tillväxten av initiala kolonisatörer gynnas av ökat utflöde av gingivalvätska med plasmaproteiner. Ett inflammatoriskt ödem kan även tänkas ge visst skydd åt det växande placket. Ökad mängd plasmaproteiner i pellikeln skulle även kunna påverka och förändra den bakteriella sammansättningen i placket.

### Syfte

Syftet med studierna var:

- att undersöka förekomsten av olika plasmaproteiner i *in vitro* pellikel på hydroxylapatit och i *in vivo* pellikel på tändernas incisala respektive gingivala del.
- att mäta adhesion av gingivit- och parodontit-associerade bakterier till experimentell plasmakomponent och salivpellikel.
- att studera förekomsten av proteiner och bakterier i dental biofilm vid frisk och inflammerad tandköttsskant.

### Material och metoder

#### *In vitro* pelliklar

Bindning av plasmakomponenter till hydroxylapatit (HA) *in vitro* undersöktes genom att inkubera HA-kulor ("konstgjorda tandtytor") i en serie av plasmaspädningar. Pelliklarna lösgjordes från HA-kulorna genom värmebehandling medsodiumdodecylsulfat (SDS). Proteinerna separerades och analyserades därefter genom gelelektrofores, silverfärgning och immunoblotting med specifika antikroppar.

#### *In vivo* pelliklar

*In vivo* bildas pellikeln av komponenter från såväl saliv som plasma. För att få en uppfattning om gingivalvätskans och därmed plasmaproteinernas inflytande på pellikelbildningen undersöktes tandtytors gingivala och incisala del separat under

såväl friska som inflammerade förhållanden.

Fem (studie I) respektive åtta (studie II) individer rekryterades. Ingångskriterierna var god allmän hälsa, friska parodontala förhållanden, inga sonderingsvärden > 3 millimeter, inga gingivala retraktioner > 3 millimeter på hörntänder och premolarer, varifrån prover togs.

I studie I togs prov direkt efter det att parodontal hälsa kliniskt diagnostiserats.

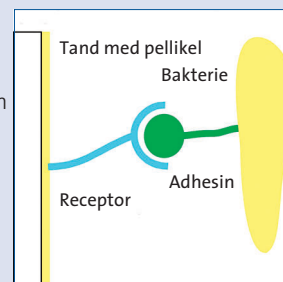
I studie II jämfördes friska och inflammerade förhållanden. Friska förhållanden skapades genom att tänderna putsades varannan dag under 14 dagar. Därefter avstod försökspersonerna från all munhygien under 5 dagar. Prover togs 14 dagar efter puts samt efter 5 dagar utan munhygien.

I båda studierna inleddes provtagningsproceduren med att tänderna putsades. Pellikel fick bildas under 60 minuter varvid ingen föda eller dryck tilläts. Tandtytorna isolerades sedan med bomullsrullar och blåstrades med vatten och luft. Pellikelproteiner samlades från lika stora delar av tändernas gingivala respektive incisala del (figur 2). Härvid gnuggades varje yta med 3 stycken Quick-Stick® innehållande 2 % SDS-lösning samt med en torr Quick-Stick® (figur 2). Alla provstickor från en yta samlades i ett provrör. Proverna behandlades med SDS-innehållande elektroforesbuffert och analyserades på samma sätt som *in vitro* pelliklarna. Proteinmängden kvantifierades med hjälp av ett bildanalysprogram (figur 3).



Stefan Rüdiger, övertandläkare, odontologie lic.

**FIGUR 1.** Fast vidhäftning av en bakterie till tandytan fås genom specifik bindning mellan receptor- och adhesinmolekyler som passar ihop enligt nyckel-lås-principen.



**FIGUR 2.** Quick-sticks® används för att samla separata pellikelprover från tändernas gingivala och incisala del.

### Bakteriell adhesion

Experimentella pelliklar skapades genom inkubering av HA i plasma och saliv och i lösningar med rena saliv- och plasmaproteiner. <sup>35</sup>S-märkta stammar av *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeslundii* och *Actinomyces viscosus* användes för att mäta adhesion till pellikel. Efter 60 minuter inkubation av pellikelklädd HA med en känd mängd märkta bakterier bestämdes antalet bundna bakterier med scintillationsräkning.

### Tidigt plack

Förutom pellikelprover togs prover av tidigt plack på de åtta försökspersonerna i studie II. Plack fick bildas på rengjorda tandytor under fyra timmar, varvid endast vatten fick konsumeras. Tandytorna isolerades med bomullsrullar och sprayades med vatten och luft och plackprover samlades med sterila depurationsinstrument. Prover för odling respektive PCR togs från kontralaterala tänder. Proverna späddes före utodling på Brucella agar och selektiva medier för bestämning av totala antalet bakterier, *Streptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella spp.*, *P. gingivalis*, *Capnocytophaga spp.* och *F. nucleatum*. PCR-teknik användes för att identifiera *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *Prevotella intermedia* och *Prevotella nigrescens*.

### Kliniska variabler

I studie II användes utflöde av gingivalvätska och plackbildningshastighet för att uppskatta graden av gingivit. Mängden av gingivalvätska mättes med Perio papers® och en Periotron 6000® apparat. Efter puts av tänderna (hela bettet) bestämdes mängden plack som bildats under 24 timmar samt blödning vid sondering.

### Resultat och diskussion

#### *In vitro* pelliklar

Alla plasmaproteiner som testades kunde identifieras efter immunoblotting. Färgningen minskade parallellt med minskad koncentration av plasma vid pellikelbildningen. Ett undantag var albumin. Trots att plasmakoncentrationen som användes för pellikelbildning var hög var färgningen av albumin initialt låg och ökade till ett maximum vid en plasmaspädning av 1/80. Dessa observationer visade att proteiner i olika mängd och med olika affinitet till HA tävlar om bindningsställen på HA och att proteiners affinitet till HA tycks vara viktigare för adsorptionsprocessen än deras koncentration.

#### *In vivo* pelliklar

I *in vivo* pelliklar observerades plasmaproteinerna IgG, albumin, fibrinogen och fibronectin i > 60

procent av proverna. Bildanalys av silverfärgade geler och immunoblottar visade högre totalmängd och högre koncentration av de specifika proteinerna i gingivala pelliklar jämfört med incisala pelliklar.

Skillnaden mellan gingivala och incisala pelliklar sågs tydligt under friska förhållanden. Den totala proteinmängden och mängden av specifika plasmaproteiner ökade signifikant ( $p < 0,05$ ) under inflammerade förhållanden (figur 3). Skillnaden mellan gingivala och incisala pelliklar var då inte längre statistiskt signifikant, vilket tyder på att en mätning skedde i den gingivala pellikeln medan den incisala pellikeln fortfarande kunde binda proteiner. Salivproteiner observerades i färre antal prover än plasmaproteiner vilket bland annat kan ha berott på en lägre detektionsgräns för de senare. Vid inflammation var emellertid mängden eller förekomsten av specifika salivproteiner förhöjd eller oförändrad på båda delar av tanden.

### Bakteriell adhesion

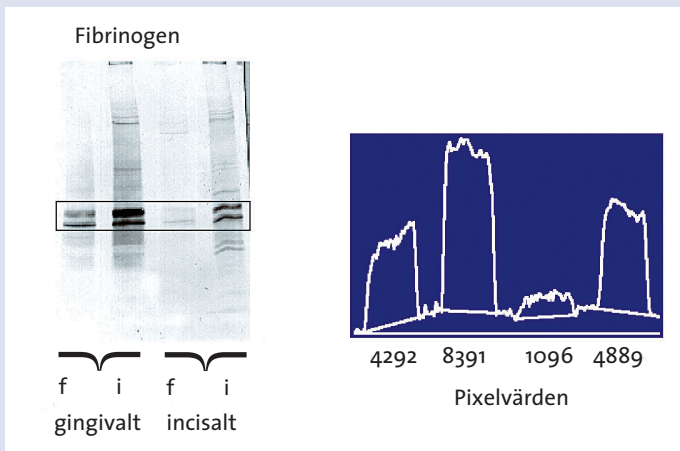
*Actinomyces spp.* adhererade i störst antal, följt av *F. nucleatum* och *P. gingivalis*, vilket motsvarar vad man normalt finner i supragingivalt plack.

Salivpelliklar band högst antal bakterier. Bakterier band emellertid även till sådana plasmaproteiner som kunde återfinnas i *in vivo* pellikel och särskilt nära gingivan. Detta tyder på att plasmaproteiner har betydelse för orala bakteriers adhesion till tandytan.

### Tidigt plack

Under friska förhållanden observerades högre antal bakterier på den gingivala än på den incisala delen av tandytan. Under inflammerade förhållanden ökade det totala antalet bakterier, speciellt på den incisala delen (figur 4). *Streptococci* och *Actinomyces spp.* identifierades i majoriteten av prover (> 70 %). Övriga bakterier var mindre vanliga ( $\leq 20$  %). *Streptococci* och *Actinomyces spp.* som främst tycks binda till salivproteiner i pellikeln observerades i högre proportioner i den incisala delen, vilken innehåller färre plasmaproteiner än den gingivala delen. I överensstämmelse med tidigare studier minskade antalet streptococci vid inflammation. Även antalet *Actinomyces spp.* minskade eller var oförändrat. Detta skiljer sig från observationer i tidigare studier där man i regel undersökt äldre plack.

I motsats till odlingstekniken kunde PCR-analysen skilja mellan de två svart-pigmenterade arterna *P. intermedia* och *P. nigrescens*. *P. intermedia*, som är mer associerad med gingivit och parodontit än *P. nigrescens*, hittades endast i ett av de 128 proverna medan *P. nigrescens* upptäcktes i 3 till 25 procent av proverna.



**FIGUR 3.** Immunoblotanalys av fibrinogen i gingivala och incisala pelliklar under friska (f) och inflammerade (i) förhållanden. Membran (liksom färgade geler) scannades in och banden markerades (till vänster). Svärtningsgraden i det markerade bildavsnittet överfördes till diagramform. Ytan under det kurvutslag som motsvarade svärtning på membranet (respektive färgad gel) uttrycktes slutligen som ett pixelvärde (till höger).

### Kliniska variabler

Både utflöde av gingivalvätska och plackbildningshastighet ökade vid inflammation ( $p < 0,05$ ). Blödning vid sonering översteg aldrig 5 procent. Detta visade att pellikel som samlades efter fem dagar utan munhygien hade bildats under ökat utflöde av gingivalvätska men utan påverkan av blödning. Detta är av betydelse eftersom vår avsikt var att undersöka plasmakomponenter i pellikeln som härstammar från gingivalvätskan.

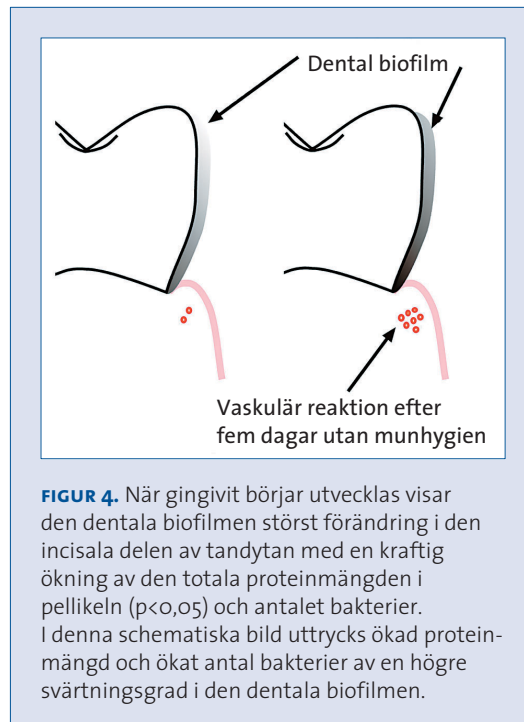
### Konklusioner

- i) Plasmaproteiner förekommer i dental pellikel. De finns både i experimentell *in vitro* pellikel bildad på HA och *in vivo*. De kan påvisas i större mängd på den gingivala än på den incisala delen av tandytan.
- ii) Bakterier associerade med gingivitis och parodontit kan binda till plasmakomponenter i *in vitro* pelliklar.
- iii) Under inflammerade förhållanden tycks mängden plasmaproteiner och antalet bakterier öka på tandytan. Förekomsten av bakterier associerade med gingivitis och parodontit ökar och de förekommer oftare i närheten av gingivalkanten än på den incisala delen av tandytan.

Dessa observationer antyder att närvaron av plasmaproteiner i pellikeln, åtminstone delvis, kan styra den bakteriella sammansättningen av tidigt dentalt plack.

### Adress:

Stefan Rüdiger,  
Specialistkliniken för parodontologi och endodonti,  
Folk tandvården Skåne, Spårväggsgatan 12, 214 27 Malmö  
E-post: stefan.rudiger@skane.se



**FIGUR 4.** När gingivitis börjar utvecklas visar den dentala biofilmen störst förändring i den incisala delen av tandytan med en kraftig ökning av den totala proteinmängden i pellikeln ( $p < 0,05$ ) och antalet bakterier. I denna schematiska bild uttrycks ökad proteinmängd och ökat antal bakterier av en högre svärtningsgrad i den dentala biofilmen.

### Referenser

1. Carlén A, Rüdiger SG, Loggner I, Olsson J. Bacteria-binding plasma proteins in pellicles formed on hydroxyapatite *in vitro* and on teeth *in vivo*. *Oral Microbiology and Immunology* 2003; 18: 203–7.
2. Rüdiger SG, Carlén A, Meurman JH, Kari K, Olsson J. Dental biofilms at healthy and inflamed gingival margins. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 524–30.