



Characterization of Polymorphonuclear Neutrophils in the Oral Cavity. A Double-edged Sword
P. Rijkschroeff

Nederlandse samenvatting

Dit is een korte samenvatting in de Nederlandse taal van het proefschrift getiteld "Characterization of polymorphonuclear neutrophils in the oral cavity", geschreven door Patrick Rijkschroeff. Polymorfonucleaire neutrofielen (PMN's) zijn witte bloedcellen die in de weefsels micro-organismen opnemen en vervolgens intern kunnen doden en verteren. Een introductie omtrent de kenmerken en functionele eigenschappen van deze cellen is nader belicht in **hoofdstuk 1**. Hierbij is tevens het belang van, en de motivatie naar wetenschappelijk onderzoek gericht op de PMN's in de mondholte verder toegelicht. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een kort overzicht van de uitgevoerde onderzoeken die in dit proefschrift zijn opgenomen. Het proefschrift is verder onder te verdelen in 2 secties. Het eerste gedeelte bevat 3 onderzoeken waarbij de orale PMN's onderzocht waren in relatie tot een gezonde mond (hoofdstukken 2, 3 en 4). En het tweede gedeelte bevat 2 onderzoeken, waarbij de orale PMN's waren onderzocht gerelateerd aan een ontstoken mondsituatie (hoofdstukken 5 en 6). Voor al deze onderzoeken waren de proefpersonen gevraagd om mondspoelingen en/of bloed te doneren, waaruit PMN's konden worden geïsoleerd en geanalyseerd. Indien er, na het lezen van deze samenvatting, enige onduidelijkheid bestaat over het uitgevoerde onderzoek, dan dient het desbetreffende hoofdstuk in de Engelse taal als referentie gebruikt te worden.

In **hoofdstuk 2** waren orale PMN's onderzocht behorende bij een onderzoekspopulatie van 268 gezonde proefpersonen met een gezonde (ontstekingsvrije) mond. Meerdere kenmerken van orale PMN's waren in deze studie onderzocht, waaronder cel aantallen, cel cyclus, cel activatie status en zuurstof radicalen (ROS) productie. Deze kenmerken werden vergeleken met PMN's afkomstig uit bloed. De orale PMN's bevonden zich in een verhoogde staat van cel activatie in vergelijking met PMN's uit de bloedbaan. Verder werd aangetoond dat de orale PMN's meer beschadigd waren en dat deze zich in een later fase van de cel cyclus bevonden dan de PMN's uit bloed. Desondanks, werd er een vergelijkbare functionele response (ROS productie) geobserveerd tussen orale PMN's en de bloed PMN's, wanneer deze in contact kwamen met een frequent voorkomende anaërobie, gram negatieve mondbacterie (*Fusobacterium nucleatum*). De resultaten van dit onderzoek suggererend dat orale PMN's functionele activiteit kunnen vertonen welke bij kan dragen aan het in standhouden van een oraal equilibrium.

Hoofdstuk 3 heeft orale PMN's gekarakteriseerd bij een specifieke groep proefpersonen, namelijk mensen met een kunstgebit, met een gezonde mond. De orale PMN's van de tandeloze patiënten (edentate patiënten) werden onderzocht voor de aanwezigheid van orale PMN's, beschadigde / dode PMN's (apoptosis/necrosis), voor membraan markers voor cel activatie (CD11, CD63, CD66) en ROS productie. Orale PMN's waren terug te vinden in de mondspoelsels van de edentate patiënten. Het aantal orale PMN's lag echter aanzienlijk lager in vergelijking met de deelnemers met tanden en kiezen (dentate proefpersonen) uit dit onderzoek. Verder bleek dat het percentage van aanwezige beschadigde (apoptotische/necrotische) orale PMN's aanzienlijk hoger lag bij de edentate proefpersonen in vergelijking met de dentate proefpersonen. De resultaten betreffende de analyse van de cel activatie markers CD11, CD63 en CD66 én de analyse van de functionele ROS respons, toonden aan dat de orale PMN's van edentaten niet meer functioneel actief waren en tevens niet meer responsief reageerden op externe stimuli. De deelnemende proefpersonen met een kunstgebit hadden in vergelijking met de deelnemers met hun eigen tanden en kiezen dus lagere aantallen orale PMN's, welke aanzienlijk beschadigd en functioneel inactief waren. Desondanks bleek dat PMN's geïsoleerd uit bloed functioneel actief waren en tevens vergelijkbare kenmerken vertoonden tussen de edentaten en dentaten. Het belang voor het behoud van tanden en kiezen is in dit hoofdstuk nader belicht, waarbij het verschil in anatomische structuren rondom de tanden werd besproken en waarbij de aanwezigheid van crevulaire vloeistof in de mond wederom een belangrijke bron is gebleken voor de orale PMN's. Deze veranderingen hebben mogelijk een effect op de specifieke tak van de aangeboren immunologische afweer in de mond bij patiënten met een kunstgebit, met als gevolg een verminderde weerstand tegen perturbatie en een verminderde adaptie ten gevolge van een verstoring van de orale microbiële flora (dysbiose).

Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 4**, was opgezet met als doel om te evalueren in hoeverre de eerder genoemde karakteristieken van orale PMN's, te verklaren waren door het contact met speeksel. PMN's geïsoleerd uit bloed werden gedurende 1 uur in contact gebracht met humaan speeksel en een kunstmatig speekselbuffer, welke de hypotonische compositie van humaan speeksel benaderde. De morfologie van PMN's werd onderzocht op de membraan integriteit met behulp van flowcytometrie. Tevens werd de interne morfologie geanalyseerd met behulp van transmissie elektronen microscopie. Potentiele veranderingen van enkele functionele eigenschappen (adhesie, fagocytose en ROS productie) van PMN's werden nader onderzocht in de aanwezigheid van speeksel. Humaan speeksel bleek geen effect te hebben op de morfologie en ook geen effect te hebben op de functionele eigenschappen van PMN's. Dit impliceert dat orale PMN's, specifieke karakteristieken verkrijgen tijdens het migratie proces naar de mondholte toe.

Mogelijk resulteren deze uit een verdere interactie met de parodontale en orale mondomgeving. De resultaten uit dit onderzoek toonden verder aan dat humaan speeksel een interactie aangaat met *Fusobacterium nucleatum*. Hierdoor kan de bacterie minder goed worden herkend door de PMN (verminderde adhesie) met als gevolg een gedempte functionele response (verlaagde ROS productie).

In **hoofdstuk 5** werden orale PMN kenmerken gekarakteriseerd bij patiënten met een chronische ontsteking aan het tandvlees en de onderliggende weefsels als bindweefsel, wortelcement en kaakbot (parodontitis). Orale PMN's en bloed PMN's werden bestudeerd voor vergelijkbare kenmerken als eerder beschreven in hoofdstuk 3. Tevens werden deze spoelsamples nader onderzocht voor de aanwezigheid van eiwit afbrekende enzymen (protease activiteit). Bij parodontitis patiënten werden significant hogere aantallen orale PMN's geïsoleerd uit de mondspoelsels, in vergelijking met de controle groep (deelnemers zonder parodontitis). Zowel de orale PMN's van parodontitis patiënten, als van de gezonde controles, waren sterk geactiveerd in vergelijking met PMN's uit bloed. Hogere aantallen beschadigde orale PMN's werden gevonden bij parodontitis patiënten, met een verhoogde CD11 expressie. In reactie op externe stimuli (phorbol myristate acetate en *Fusobacterium nucleatum*) toonden de orale PMN's wel het vermogen om ROS te produceren. Verder werd bij parodontitis patiënten een verhoogde protease activiteit gedetecteerd uit de mondspoelingen. De resultaten van dit onderzoek suggereren dat de hoge aantallen beschadigde orale PMN's (in combinatie met de verhoogde activatie), resulteren in het extracellulair vrijkomen van antimicrobiële enzymen en andere schadelijke moleculen in de mondomgeving bij parodontitis patiënten. Ondanks dat de orale PMN's van origine een beschermende rol voor de mond hebben, kunnen deze functionele kenmerken van orale PMN's een nadelig gevolg hebben voor de mondomgeving, waarbij deze schadelijke moleculen de integriteit van de mondweefsels onbedoeld aan kan tasten.

Hoofdstuk 6 betreft een onderzoek naar messenger RNA transcripts, en de bijbehorende gen expressies van de orale PMN gedurende experimentele gingivitis. Gedurende een periode van 2 weken werd er aan de deelnemende proefpersonen gevraagd om te stoppen met hun dagelijkse mondhygiëne routine. Als gevolg hiervan werd een toenemende hoeveelheid tandplaque langs de gingiva rand waargenomen en ontstoken tandvlees (gingivitis) in de mond van deze gezonde proefpersonen. Tijdens deze experimentele gingivitis fase stegen de aantallen orale PMN's en werd het gen expressie profiel (transcriptoom) in kaart gebracht. Het transcriptoom op dagen 9 en 14, werd vergeleken met het transcriptoom op dag 0 (baseline). Dit resulteerde in 2 hoofd-clusters van genen (initiële- & latere respons genen), welke betrokken waren bij de initiatie en ontwikkeling van gingivitis. Na de

experimentele gingivitis periode, mochten de deelnemende proefpersonen hun dagelijkse mondhygiëne routine weer oppakken, waarbij resolutie van de gingivitis klinisch werd waargenomen (afname tandplaque en bloeding). Dit resulteerde in een 3^e hoofd-cluster van genen, welke gerelateerd waren aan deze genezingsfase. De combinatie van genen binnen de clusters waren gerelateerd aan de verschillende functionele pathways, zoals PMN functionaliteit en activatie van het immuunsysteem. De resultaten van dit onderzoek toonden een grote complexiteit voor orale PMN's aan. Een functioneel en dynamisch respons werd op gen niveau aangetoond, waarbij er duidelijke aanwijzingen zijn voor de immuno-regulerende rol van orale PMN als onderdeel van een functioneel aangeboren immuun respons in de mond.

Het proefschrift wordt afgesloten met **hoofdstuk 7**. Dit hoofdstuk bevat een algemeen overzicht van de uitgevoerde onderzoeken en dient mede als samenvatting in de Engelse taal. Dit hoofdstuk bespreekt de bevindingen uit de vorige hoofdstukken volgens de structuur uit hoofdstuk 1. Verder bediscussieert dit hoofdstuk de ambivalente rol voor orale PMNs, waarbij hun aanwezigheid zowel beschermend als schadelijke kan zijn voor de mond. De studie naar orale PMNs is vooralsnog een onderbelicht gebied. De uitdaging voor toekomstige studies ligt in het toepassen van deze fundamentele kennis en deze om te zetten naar een klinische setting. Hierbij kan er gedacht worden aan potentiële toepassingen zoals een surrogaat (bio)marker gericht op diagnostiek en preventie (screening tool), of ook met betrekking tot individuele behandel strategieën. Ondanks dat dit proefschrift bij heeft kunnen dragen aan ons begrip over homeostase en dysbiose in de mond, zullen vele vragen vooralsnog onbeantwoord blijven. De studies uit dit proefschrift kunnen hierbij dienen als naslag voor toekomstige studies, waar de gerapporteerde resultaten mogelijk als referentie waarden kunnen fungeren in de zoektocht naar de rol van PMNs bij (orale) pathologie.